

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y
APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS DE
LA LISOZIMA DEL BACTERIOFAGO Cp-I
DE NEUMOCOCO**

Jesús Miguel Sanz Morales
Madrid, 1992

Colección Tesis Doctorales. N.º 206/92

© Jesús Miguel Sanz Morales

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1992.**

Ricoh 3700

Depósito Legal: M-25119-1992



La Tesis Doctoral de D. ...JESUS.MIGUEL.SANZ....
MORALES

.....
Titulada "ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y APLICACIONES BIO-
TECNOLOGICAS DE LA LISOZIMA DEL BACTERIOFAGO CP-1
DE NEUMOCOCO"

Director Dr. D. ...JOSE L. GARCIA LOPEZ y D. PEDRO GARCIA
GONZALEZ

fue leida en la Facultad de ...CIENCIAS QUIMICAS
de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, el día .2....
de ...OCTUBRE..... de 19 91..., ante el tribunal

constituido por los siguientes Profesores:

PRESIDENTE ...D. FRANCISCO GARCIA BLANCO.....

VOCALD. JOSE GAVILANES FRANCO.....

VOCALD. JOSE MANUEL GUISAN SEIJAS.....

VOCALD. JOSE MANUEL ANDREU MORALES.....

SECRETARIO ...D. FRANCISCO GAVILANES FRANCO.....

.....
habiendo recibido la calificación de *APTO. CON*...

LAUDE *COMPROMISADA*
.....

Madrid, a 2 de *Octubre* de 19*91*.

EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.

F. Gavilanes

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LA
LISOZIMA DEL BACTERIOFAGO Cp-I DE NEUMOCOCO**

Memoria que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas presenta:

JESUS MIGUEL SANZ MORALES

Directores de la Tesis

Dr. José Luis García López
Investigador Científico

Dr. Pedro García González
Colaborador Científico

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Madrid, 1991

A mis padres

A mi hermano

Quisiera expresar desde aquí mi gratitud a todas aquellas personas que, de alguna u otra manera, me han ayudado en la realización de este trabajo experimental en el Centro de Investigaciones Biológicas (C.I.B.) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

De manera especial, quiero agradecer a mis directores José Luis García López y Pedro García González la formación científica que de ellos he recibido. Son personas que han demostrado conmigo una paciencia, profesionalidad, amistad y calidad humana de tal magnitud que no me habría importado ser su becario predoctoral durante décadas.

Por otra parte, deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Rubens López por haberme aceptado en su laboratorio, así como por sus sabios consejos, comentarios y sugerencias y su apoyo en todo momento. De igual manera, agradezco al Dr. Ernesto García su colaboración en muchos aspectos de este trabajo y su constante ayuda profesional y moral a lo largo de mi estancia en el laboratorio. Asimismo, la Dra. Concepción Ronda ha sido para mí una amiga entrañable en la que siempre encontré afecto y comprensión.

Agradezco profundamente al resto de mis compañeros del laboratorio, los doctores Eduardo Díaz, Alicia Romero, José María Sánchez-Puelles y Christian Croux, así como a María Auxiliadora Prieto y Ana Isabel Rodríguez, su disposición a crear alrededor mío un ambiente inigualable de amistad y compañerismo. Asimismo, la excelente asistencia técnica de Eloísa Cano, Manuel Carrasco y Remedios Galdón ha facilitado enormemente la realización de este trabajo experimental.

Quiero agradecer a los doctores José Laynez, Pilar Usobiaga, y Margarita Menéndez su colaboración en los trabajos de calorimetría. Asimismo, agradezco a Santiago Rodríguez de Córdoba, José Manuel Andreu y Enrique Méndez toda la ayuda y colaboración que han prestado en diversos aspectos de este trabajo. También agradezco a Fernando Díaz su inestimable ayuda en las labores de ordenador.

Mi agradecimiento al director del departamento de Bioquímica y Biología molecular, Dr. José Gavilanes, por haber facilitado la lectura de esta Tesis, y a la Dra. Felicísima Mata por haber aceptado ser ponente de la misma.

Quiero recordar aquí a los miembros del C.I.B. que de alguna manera han colaborado en este trabajo, de modo especial a Aurelio Hurtado, Rosa Díaz y José Blanco por su dedicación en las labores de delineación y fotografía.

Por último, agradezco a mi familia todo el apoyo y cariño que me han profesado durante este tiempo.

El presente trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

ABREVIATURAS

Δ	: deleción; incremento
Ap	: ampicilina
dATP	: desoxiadenosina 5'-trifosfato
CD	: dicroísmo circular
Ci	: curio
Cm	: cloranfenicol
Cp	: capacidad calorífica
cpm	: cuentas por minuto
Da	: dalton
DEAE	: <i>N,N</i> -dietilaminoetanol
DSC	: calorimetría diferencial de barrido
DTNB	: 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
EA	: etanolamina
EDTA	: etilendiaminotetraacetato
ϵ_{280}	: coeficiente de extinción molar a 280 nm
g	: aceleración de la gravedad
ΔG	: incremento de energía libre
GEWL	: lisozima de huevo de ganso
ΔH	: incremento de entalpía
ΔH_{vH}	: entalpía de van't Hoff
HEWL	: lisozima de huevo de gallina
IAA	: ácido yodoacético
IPTG	: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
K	: grado Kelvin
Kan	: kanamicina
K_d	: constante de disociación
kb	: 1000 pares de bases
K_{sv}	: constante de Stern-Volmer
LB	: medio de cultivo de Luria y Bertany
LMT	: gel de agarosa de bajo punto de fusión
LTA	: ácido lipoteicoico
M_r	: masa molecular relativa
N	: medida de la concentración celular por nefelometría
NAG	: <i>N</i> -acetilglucosamina
NAM	: ácido <i>N</i> -acetilmurámico
ONPG	: <i>o</i> -nitrofenil-galactósido
PAGE	: electroforesis en geles de poliacrilamida
Pollk	: fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de <i>E. coli</i>
p/p	: relación peso/peso
p/v	: relación peso/volumen
r	: resistencia
RBS	: sitio de unión al ribosoma
ΔS	: incremento de entropía
SDS	: dodecil sulfato sódico
T4L	: lisozima del bacteriófago T4
Tc	: tetraciclina
TM	: tampón Tris-maleato
T_m	: temperatura de fusión
Tris	: 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
θ	: elipticidad molar
UFC	: unidades formadoras de colonia
v/v	: relación volumen/volumen
X-GAL	: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

INDICE

<u>I. INTRODUCCION</u>	Pág.
1. ESTRUCTURA DE LA PARED BACTERIANA	2
1.1. Estructura del peptidoglicano	3
1.2. Los ácidos teicoicos	7
1.3. La pared celular de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	8
2. ENZIMAS QUE DEGRADAN EL PEPTIDOGLICANO	13
2.1 Autolisinas bacterianas	13
2.2. Enzimas líticas de bacteriófagos.....	14
2.2.1. Enzimas líticas de fagos que infectan a bacterias Gram-negativas.....	14
2.2.2. Enzimas líticas de fagos que infectan a bacterias Gram-positivas	15
2.3. Las enzimas líticas de <i>S. pneumoniae</i> y sus bacteriófagos.....	16
2.3.1. La principal autolisina de neumococo (LYTA)	16
2.3.1.1. El proceso de activación (conversión).....	17
2.3.1.2. Inhibición de la actividad catalítica de la amidasa LYTA	18
2.3.2. Características de la glucosaminidasa de neumococo.....	19
2.3.3. Enzimas líticas de bacteriófagos que infectan a <i>S. pneumoniae</i>	19
2.4. Estructura modular de las enzimas líticas de <i>S.pneumoniae</i> y sus bacteriófagos.....	21
3. LAS LISOZIMAS	26
3.1. Tipos de lisozimas	26
3.2 Mecanismo de acción de las lisozimas.....	27
3.3. Papel biológico de las lisozimas.....	30
4. OBJETIVOS	32

II MATERIALES Y METODOS

1. ESTIRPES BACTERIANAS, BACTERIOFAGOS Y PLASMIDOS	35
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	35

2.1. <i>S. pneumoniae</i>	33
2.2. <i>E. coli</i>	33
3. CURACION FENOTIPICA DE NEUMOCOCO	38
4. PROCEDIMIENTOS DE TRANSFORMACION GENETICA	38
5. OBTENCION DE EXTRACTOS CRUDOS DE CULTIVOS CELULARES	38
6. TECNICAS DE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR EN <i>E. coli</i>	39
6.1. Fraccionamiento subcelular mediante choque osmótico.....	39
6.2. Fraccionamiento subcelular mediante la formación de esferoplastos.....	40
7. OBTENCION DE LAS PAREDES CELULARES DE NEUMOCOCO	40
7.1. Marcaje radiactivo de las paredes celulares	40
7.2. Aislamiento y purificación de las paredes celulares	41
8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA	41
8.1. Determinación de la actividad de las enzimas que hidrolizan la pared celular de neumococo	41
8.1.1. Ensayo enzimático de los extractos obtenidos de <i>E. coli</i>	41
8.1.2. Ensayo enzimático de las proteínas purificadas.....	42
8.1.3. Caracterización del tipo de actividad lítica	43
8.2 Ensayo de actividad de β -galactosidasa.....	43
9. PURIFICACION DE LAS ENZIMAS LITICAS DE PARED DE NEUMOCOCO Y DE SUS BACTERIOFAGOS	43
9.1. Purificación mediante cromatografía de afinidad en Sepharosa-colina.....	43
9.2. Purificación de la lisozima CPL1 por cromatografía de penetrabilidad	44
9.3. Purificación de la lisozima CPL7	44
9.4. Purificación desde geles de poliacrilamida.....	45
10. VALORACION DE CONCENTRACIONES DE PROTEINA PURA	45
11. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS	46

12. DETERMINACION DE SECUENCIAS N-TERMINALES DE PROTEINAS	46
13. PREPARACION DE PLASMIDOS	46
14. MANIPULACION DEL DNA CON ENZIMAS DE USO COMUN EN BIOLOGIA MOLECULAR	46
15. ELECTROFORESIS DEL DNA EN GELES DE AGAROSA	47
16. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS FRAGMENTOS DE DNA	47
16.1. Geles de poliacrilamida	47
16.2. Técnica del Geneclean	48
16.3. Geles de agarosa de bajo punto de fusión	48
17. SECUENCIACION DEL DNA	48
18. MUTAGENESIS DIRIGIDA	48
19. TECNICA DE "WESTERN-BLOT"	49
20. MICROSCOPIA ELECTRONICA	49
21. PREDICCION DE ESTRUCTURA SECUNDARIA	49
22. DICROISMO CIRCULAR	50
23. VALORACION DE CISTEINAS LIBRES Y BLOQUEO CON IAA	50
24. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	51
25. EXPERIMENTOS DE CALORIMETRIA	51
25.1. Calorimetría diferencial de barrido	51
25.2. Calorimetría isoterma en flujo	51

III RESULTADOS

1. NUEVO METODO DE PURIFICACION DE LAS ENZIMAS LITICAS DEPENDIENTES DE COLINA DE NEUMOCOCCO Y SUS BACTERIOFAGOS	54
1.1. Estudio de la conversión de la amidasa LYTA con análogos de colina	54

1.2. Purificación de las enzimas dependientes de colina en un solo paso mediante columnas de DEAE-celulosa	55
1.2.1. Purificación de la amidasa LYTA a homogeneidad electroforética	55
1.2.2. Purificación de otras murein hidrolasas	58
1.2.3. Optimización de las condiciones de purificación	58
1.2.4. Uso de otros tipos de resina	62
2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA LISOZIMA CODIFICADA POR EL BACTERIOFAGO Cp-I (LISOZIMA CPLI)	63
2.1. Construcción de un vector que hiperexpresa la lisozima CPLI	63
2.2. Condiciones óptimas de producción de la lisozima CPLI	65
2.3. Algunos datos bioquímicos de la lisozima CPLI	65
2.4. Análisis estructural de la lisozima CPLI	67
2.4.1. Estudios de diroísmo circular	67
2.4.1.1. Efecto de diversos agentes sobre los espectros de diroísmo circular	67
2.4.2. Predicción de la estructura secundaria de la lisozima CPLI	71
2.4.3. Experimentos de apagamiento de fluorescencia	73
2.4.4. Valoración de cisteínas libres en la lisozima CPLI	77
2.5. Localización subcelular de la lisozima CPLI en <i>Escherichia coli</i>	77
3. CARACTERIZACION DE LA INTERACCION DE LA LISOZIMA CPLI CON COLINA	79
3.1. Termodinámica de la unión de colina a la lisozima CPLI	79
3.2. Cambios conformacionales de la lisozima CPLI inducidos por colina	79
3.2.1. Estudios de diroísmo circular	79
3.2.2. Experimentos de fluorescencia	82
4. LA ESTRUCTURA MODULAR DE LAS LISOZIMAS DE LOS BACTERIOFAGOS Cp-I Y Cp-7	85
4.1. Estudios sobre el dominio C-terminal de la lisozima CPLI obtenido por ingeniería genética (C-CPLI)	85
4.1.1. Clonación y expresión de la región 3' del gen <i>cplI</i>	85
4.1.2. Purificación de la proteína C-CPLI	85

4.1.3. Estudios de diroísmo circular	87
4.1.4. Inhibición de la actividad lítica de las murein hidrolasas de neumococo por la proteína C-CPLI	90
4.1.5. Valoración de la cisteína libre de la proteína C-CPLI	90
4.2. Obtención del dominio N-terminal de la lisozima CPLI (N-CPLI) por ingeniería genética	92
4.2.1. Actividad de la proteína N-CPLI	92
4.3. Experimentos de proteólisis controlada	96
4.3.1. Obtención de los dominios N-terminales de las lisozimas CPLI y CPL7 (fragmentos F1 y F7) por digestión controlada con tripsina	96
4.3.1.1. Análisis estructural de los polipéptidos F1 y F7	98
4.3.1.2. Análisis funcional de las proteínas F1 y F7	99
4.3.2. Digestión con otras enzimas proteolíticas	105
4.4. Estudios calorimétricos de la estabilidad térmica de la lisozima CPLI ...	105
4.4.1. Estudios de DSC sobre la proteína completa	105
4.4.1.1. Efecto del pH	108
4.4.2. Estudios sobre el dominio C-terminal	113
4.4.3. Estudios sobre el dominio N-terminal	113
4.4.4. Efecto de la colina sobre la desnaturalización térmica de la lisozima CPLI	116
5. MECANISMO DE REACCION DE LA LISOZIMA CPLI	120
5.1. Mutagénesis dirigida del gen <i>cplI</i>	120
5.1.1. Introducción de aminoácidos polares	120
5.1.2. Actividad enzimática de los mutantes	123
5.1.3. Introducción de un aminoácido apolar	124
5.2. Análisis estructural y funcional de los mutantes	126
5.3. Actividad de los mutantes <i>in vivo</i>	126
5.4. Requerimiento del componente peptídico del peptidoglicano para la actividad lítica de la lisozima CPLI	128
6. APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS DE LOS DOMINIOS C-TERMINALES DE LAS PEPTIDOGLICAN-HIDROLASAS DE S. PNEUMONIAE	131

6.1. Fusiones del dominio C-terminal de la lisozima CPL1 con la β-galactosidasa	131
6.1.1. Obtención de la proteína híbrida C-CPL1- β -galactosidasa con el dominio de reconocimiento de colina como región N-terminal	131
6.1.2. Inmovilización de la proteína en columna	133
6.1.3. Construcción de la proteína híbrida β -galactosidasa-C-CPL1 (C-CPL1 como región C-terminal)	135
6.2. Construcción de una proteína de fusión C-LYTA-TcR88.1	138
6.2.1. Purificación de la proteína híbrida C-LYTA-TcR88.1	140
 <u>IV DISCUSION</u>	
 1. UN NUEVO METODO DE PURIFICACION DE LAS PEPTIDOGLICAN-HIDROLASAS DE NEUMOCOCO DEPENDIENTES DE COLINA	145
2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA LISOZIMA CPL1 Y DE SU INTERACCION CON COLINA	148
3. LA ESTRUCTURA MODULAR DE LAS LISOZIMAS CPL1 Y CPL7	152
4. MECANISMO DE REACCION DE LA LISOZIMA CPL1	157
5. APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS DE LOS DOMINIOS C-TERMINALES DE LAS PEPTIDOGLICAN-HIDROLASAS DE <i>S. PNEUMONIAE</i>	162
 <u>V CONCLUSIONES</u>	167
 <u>VI BIBLIOGRAFIA</u>	171

1 INTRODUCCION

I. ESTRUCTURA DE LA PARED BACTERIANA

Las bacterias, al igual que otros microorganismos, han tenido que desarrollar una estructura protectora a modo de exoesqueleto que les permitiera la adaptación a un medio externo de características muy diferentes al medio intracelular. Dicha estructura protectora es la denominada pared bacteriana, integrada por distintos glicolípidos y heteropolisacáridos, la cual recubre por entero la membrana plasmática. La función primordial de la pared bacteriana es la protección de la célula frente al medio externo, pues entre ambos existe una diferencia de presión osmótica superior a 20 atmósferas. Asimismo, la pared bacteriana restringe la difusión de solutos y confiere a la bacteria su morfología típica.

La pared celular puede aislarse en forma insoluble manteniendo inalteradas sus características morfológicas (Shockman y Barret, 1983). La pared así obtenida puede contener, dependiendo de las especies, diversos tipos de polímeros tales como ácidos teicoicos y teicurónicos, polisacáridos ácidos o neutros, compuestos glicopeptídicos y lípidos complejos. En el caso de las eubacterias, el componente glicopeptídico de la pared se denomina peptidoglicano, mureína o muropéptido. El peptidoglicano, que constituye en peso el 50% de la pared bacteriana, está formado a su vez por cadenas polisacáridicas lineales interconectadas entre sí por medio de puentes peptídicos, y a él se asocian otros componentes accesorios característicos que diferencian a las bacterias Gram-positivas de las Gram-negativas. El peptidoglicano se dispone en un número de capas que depende de las especies, y su espesor varía entre 15 y 40 nm. La pared celular de las bacterias Gram-positivas representa entre el 15 y el 30% del peso seco de la bacteria, y posee estructura trilaminar. Aunque se pensaba que la pared celular de las bacterias Gram-negativas era una monocapa, estudios más recientes indican que puede poseer también un cierto carácter multilaminar (Labischinski y cols., 1985).

El estudio de la pared de las bacterias Gram-negativas ha mostrado una disposición de tres capas bien diferenciadas entre sí tanto estructural como funcionalmente: (1) la membrana interna, con funciones metabólicas; (2) el peptidoglicano, y (3) la membrana externa, que desempeña funciones de relación con el exterior, y que se une covalentemente al peptidoglicano, contribuyendo a la resistencia mecánica de la pared (Nikaido y Vaara, 1985).

1.1. Estructura del peptidoglicano

El componente polisacárido del peptidoglicano está constituido de polímeros alternantes de residuos de 2-N-acetilamido-2-desoxi-D-glucosa (N-acetilglucosamina, NAG) y 2-N-acetilamino-3-O-(p-1-carboxicil)-2-desoxi-D-glucosa (ácido N-acetilmurámico, NAM) unidos entre sí mediante uniones glicosídicas β -1,4. A veces, los grupos acetilo se encuentran sustituidos como acil y glicosil derivados. El NAM puede estar acetilado o fosforilado en el carbono 6, lo que permite la formación de puentes de hidrogeno con cadenas adyacentes glicánicas. Los grupos carboxilo de los restos de NAM pueden hallarse sustituidos por cadenas laterales tetrapeptídicas del tipo L-alanil-D-isoglutamil-L-R₃-D-alanina (figura 1A), aunque este esquema puede variar según las especies. Por ejemplo, el residuo de D-alanina puede no existir o estar sustituido por L-serina o glicina. El grupo α -carboxilo del ácido isoglutámico puede permanecer libre, amidado o sustituido por una glicina o por una glicinamida. También puede encontrarse el ácido treo-3-hidroxisglutámico sustituyendo al ácido isoglutámico. El residuo R₃ puede ser L-alanina, L-homoserrina, ácido L-glutámico, L-diaminobutírico, L-diaminopimélico o meso-diaminopimélico, L-ornitina o L-lisina. En la mayoría de las bacterias estudiadas, todos los residuos de NAM se encuentran sustituidos por péptidos (Schleiffer y Kandler, 1972; Ghuysen, 1977), aunque en algunas especies como *Micrococcus lisodeikticus* alrededor del 30-40% de los residuos de murámico no están sustituidos.

Las unidades peptídicas pueden a su vez unirse entre sí mediante puentes interpeptídicos, cuya proporción varía según la especie (Ghuysen, 1968). Así, el microorganismo en el que se ha encontrado mayor proporción (90%) de unidades peptídicas formando parte de enlaces cruzados es *Staphylococcus aureus*, mientras que en el otro extremo se encuentran los peptidoglicanos de *Escherichia coli* y de la mayoría de las bacterias Gram-negativas, donde este índice es de alrededor de un 25% (Nauman y cols., 1982). Dependiendo de la composición y localización de estos puentes, el peptidoglicano ha sido dividido en cuatro tipos principales (Ghuysen, 1977): En los peptidoglicanos de tipo I, II y III, el resto de D-alanina terminal forma una unión, directa o mediante otras cadenas polipeptídicas, con el grupo ϵ -amino del aminoácido básico R₃; esta unión se forma con el grupo α -carboxilo del residuo de ácido D-isoglutámico en los peptidoglicanos del tipo IV.

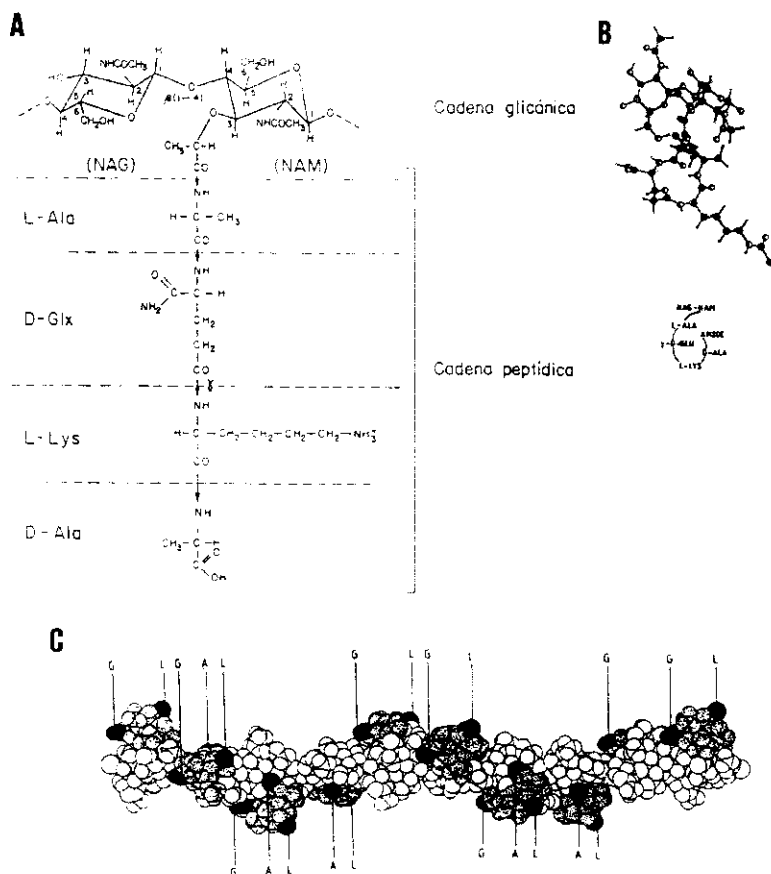


Figura 1. Estructura de una cadena de peptidoglicano.

Panel A. Estructura primaria de la cadena de peptidoglicano (cadena glicánica y cadena peptídica). Las abreviaturas utilizadas son : NAG, *N*-acetilglucosamina; NAM, *N*-acetilmurámico. Los aminoácidos de la cadena peptídica se indican en código de tres letras. D-Glx, indica que el grupo α -carboxilo del ácido D-glutámico se encuentra amidado (isoglutamina). τ , significa que el enlace peptídico tiene lugar con el grupo τ -carboxilo de la isoglutamina.

Panel B. Conformación más probable para la unidad de disacárido-tetrapéptido.

Panel C. Representación esquemática de una cadena de peptidoglicano compuesta de diez unidades repetidas de disacárido-tetrapéptido. La cadena glicánica se representa con círculos blancos. La cadena peptídica se representa con círculos punteados. Los grupos que intervienen en los enlaces interpeptídicos se indican con círculos negros: A, grupo α -carboxilo de la D-alanina terminal; L, grupo ϵ -amino de la cadena lateral de la L-lisina; G, grupo α -carboxilo del ácido D-glutámico.

Los paneles B y C. están tomados de Barnickel y cols. (1983).

El tipo más frecuente es el I, en donde la D-alanina terminal forma un enlace covalente directo con el ácido meso-diaminopimélico. Este tipo se encuentra probablemente en todas las bacterias Gram-negativas, así como en los procariotas más evolucionados como mixobacterias y cianobacterias (Jürgens y Wecknesser, 1985).

La estructura tridimensional del peptidoglicano aún se encuentra lejos de estar bien definida. El modelo propuesto por Weidel y Pelzer (1964), que considera al peptidoglicano como una macromolécula que envuelve completamente a la célula es esencialmente válido, aunque hay que desechar la idea de que el peptidoglicano se organice en enormes cadenas conectadas entre sí. De hecho, las cadenas glicánicas y las unidades peptídicas presentan muchos grupos terminales, calculándose que la longitud media de las cadenas glicánicas oscila en torno a los 35 disacáridos (Tipper, 1969; Beveridge, 1981; Glauner y Schwarz, 1983) lo que teniendo en cuenta las dimensiones de los aminoazúcares en la configuración más extendida del peptidoglicano (Formanek, 1983), supone una longitud media aproximada de 35 nm.

Las cadenas peptídicas unidas a los residuos de NAM presentan, como hemos visto, una alternancia de aminoácidos en forma L y D. Esta característica, y el enlace peptídico en γ con el ácido isogluámico, confieren al peptidoglicano resistencia a proteasas a la vez que le permiten adquirir una conformación helicoidal, con la alanina terminal próxima a la inicial (figura 1B) pudiendo interaccionar mediante enlaces de hidrógeno con la cadena glicánica (Barnickel y cols., 1983), la cual adquiere una conformación como la que se representa en la figura 1C. Para que la mureína pueda empaquetarse de modo continuo y con enlaces entrecruzados, las cadenas glicánicas deben disponerse empaquetadas en paralelo y tígeramente rotadas unas con respecto a otras (figura 2A) (Labischinski y cols., 1985). En las bacterias Gram-positivas las capas de mureína se disponen formando un ángulo de 60° con las capas adyacentes, lo que permite un máximo de conexiones interpeptídicas y la aparición de oligómeros peptídicos (figura 2B). Según Formanek (1983), una celda de la malla tridimensional del peptidoglicano tendría las dimensiones que se detallan en la figura 2C.

Según los modelos que se acaban de exponer, el peptidoglicano cumpliría los dos requisitos básicos de rigidez (debida a la cadena glicánica) y flexibilidad (por las cadenas peptídicas), cualidad

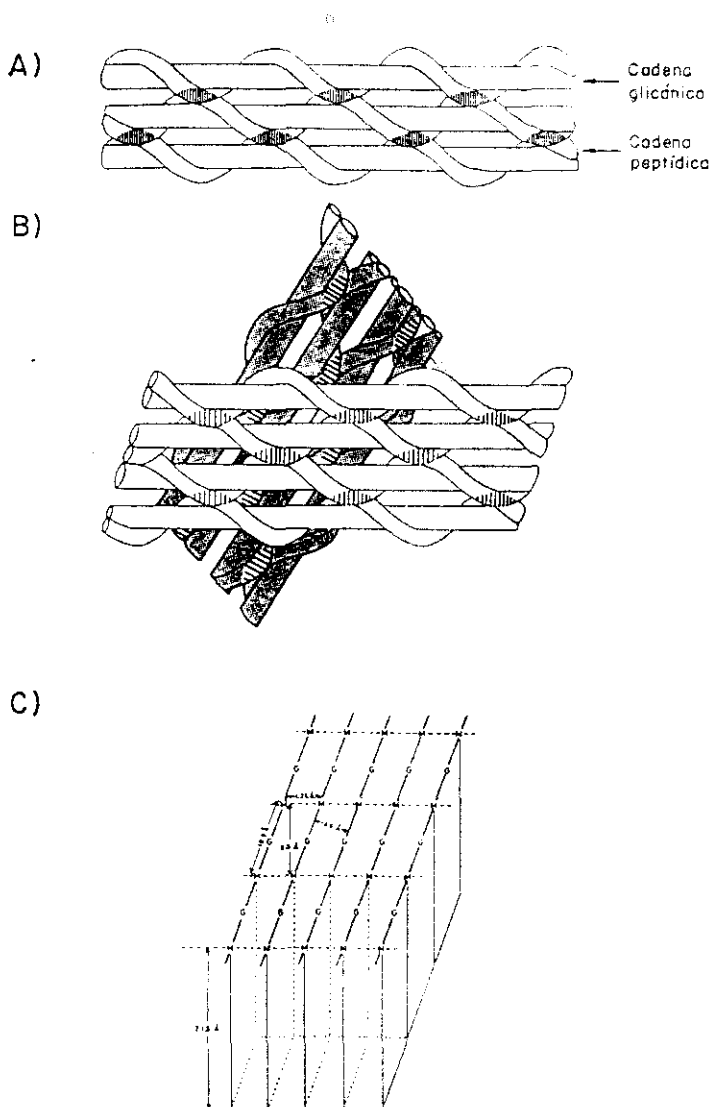


Figura 2. Modelo de la estructura tridimensional del peptidoglicano.

Panel A. Disposición paralela de las cadenas de peptidoglicano en una capa de mureína. Las regiones en las que se producen los enlaces cruzados se señalan con una zona sombreada.

Panel B. Representación esquemática de dos capas adyacentes de mureína.

Los paneles A y B están tomados de Labischinski y cols. (1985).

Panel C. Representación esquemática de la malla tridimensional del peptidoglicano. Se detallan las dimensiones de cada célula, definida por la unidad disacárido-tetrapéptido. M, ácido N-acetilmurámico; N, N-acetilglucosamina. Tomado de Formanek (1983).

esta última que permite incrementos de más del 200% en la distancia que separa a dos cadenas glicánicas adyacentes. Aunque durante mucho tiempo se creyó que el peptidoglicano tenía una estructura cristalina similar a la que presenta la quitina, estudios posteriores indicaron que la estructura del peptidoglicano puede calificarse más bien como paracristalina, con poros que permiten la interacción de proteínas de la pared, como las enzimas autolíticas. El agua representa el 92% del peso de la pared bacteriana, confiriéndole una densidad aproximada de $1,1 \text{ g/cm}^3$ y desempeñando por tanto un papel fundamental en su estructura.

1.2. Los ácidos teicoicos

Los ácidos teicoicos son polímeros de glicerol fosfato o ribitol fosfato en los que los monómeros correspondientes se unen a través de enlaces fosfodiéster (Armstrong y cols., 1958). Son sustancias muy antigénicas, y sólo se han encontrado hasta ahora en bacterias Gram-positivas. La disposición de los ácidos teicoicos es la causa de la estructura tritramelar que la pared presenta al microscopio electrónico, con las caras externa e interna más opacas que la porción central.

Inicialmente se pensó que los ácidos teicoicos se unían covalentemente al peptidoglicano mediante un enlace directo entre el grupo fosfato terminal del ácido y el carbono 6 del residuo de NAM. Sin embargo, ha podido comprobarse que, en muchas especies bacterianas, existe un compuesto intermedio, cuya identidad varía de unas especies a otras (Kojima y cols., 1985). En cuanto a las funciones de los ácidos teicoicos hay que señalar que forman parte de los receptores de bacteriófagos e intervienen como moduladores de las enzimas autolíticas. Son, además, los polianiones más importantes de la pared celular por su abundancia en grupos fosfato y le confieren carga negativa neta. Los ácidos teicoicos internos forman quelatos con el magnesio y con ello contribuyen a la rigidez del peptidoglicano (Beveridge, 1981). Cuando los ácidos teicoicos se unen covalentemente a un glicolípido de membrana, reciben el nombre de ácidos lipoteicoicos (LTA). Estos se intercalan dentro de la matriz de la pared, cumpliendo una función muy importante en la regulación de las actividades autolíticas en varios sistemas (Höltje y Tomasz, 1975a; Horne y Tomasz, 1985; Fischer, 1988). Cuando los ácidos lipoteicoicos

atravesan todo el espesor de la pared celular y son accesibles desde el exterior se comportan como importantes determinantes antigénicos.

1.3. La pared celular de *Streptococcus pneumoniae*

El espesor de la pared de *S. pneumoniae* (neumococo) oscila alrededor de los 15 nm, equivalente a unas 8 capas de peptidoglicano de 2 nm de espesor cada una (Tomasz, 1981). La estructura del componente peptídico del peptidoglicano de *S. pneumoniae* ha podido ser estudiada recientemente por García-Bustos y cols. (1987, 1990), gracias al empleo de cromatografía líquida de alta presión (figura 3A). De acuerdo con estos autores, aproximadamente el 40% de los residuos de lisina forma parte de enlaces cruzados entre unidades peptídicas. El principal péptido monomérico es el tripéptido (L-Ala-D-Gln-L-Lys) en lugar de un tetrapéptido, lo que puede indicar la presencia de D,D y D,L-carboxipeptidasas. Existen además dos tipos de puentes interpeptídicos: el más abundante es un puente cruzado L-Ala-L-Ser entre la D-Ala en posición 4 de la unidad peptídica donadora y la L-Lys de la posición 3 de la aceptora; el segundo tipo de puente es un enlace directo entre estos dos aminoácidos D-Ala(4) y L-Lys(3). Además de estos aminoácidos, también se han encontrado, aunque en proporción minoritaria, Gly y Asp, los cuales se supone que forman parte de los puentes interpeptídicos (Fischer y Tomasz, 1985).

En cuanto a los ácidos teicoicos, también denominados en *S. pneumoniae* polisacárido C, representan el 40-50% del peso seco de la pared. La disposición espacial de los ácidos teicoicos no se conoce todavía, aunque hay evidencia de que un porcentaje de ellos se localiza en la cara externa de la pared celular, por experimentos de reacción con antiseros anti-polisacárido C. La figura 3A representa esquemáticamente la estructura química de la pared celular de neumococo. Se estima que debe existir, por término medio, una cadena de ácido teicoico por cada unidad de tetradisacárido tetrapéptido (García-Bustos y Tomasz, 1987).

S. pneumoniae posee un requerimiento nutricional absoluto por el aminoalcohol colina, de tal manera que la eliminación de este compuesto del medio de cultivo provoca la detención de la multiplicación celular (Tomasz, 1967). Esta dependencia condujo al descubrimiento de que los

A

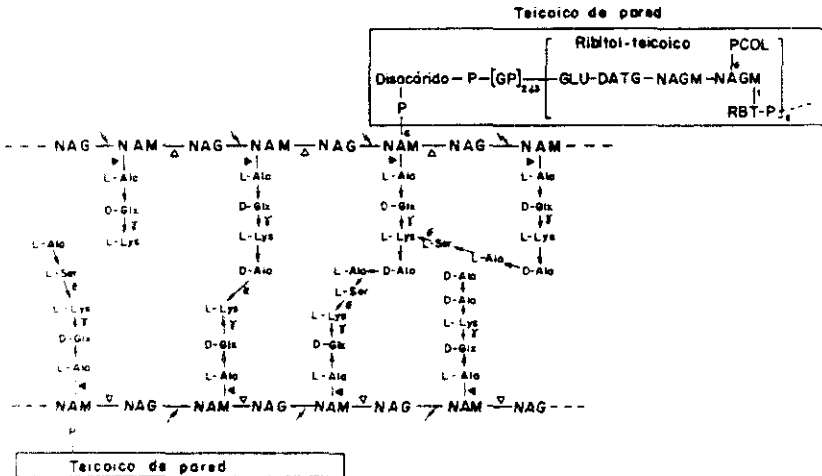
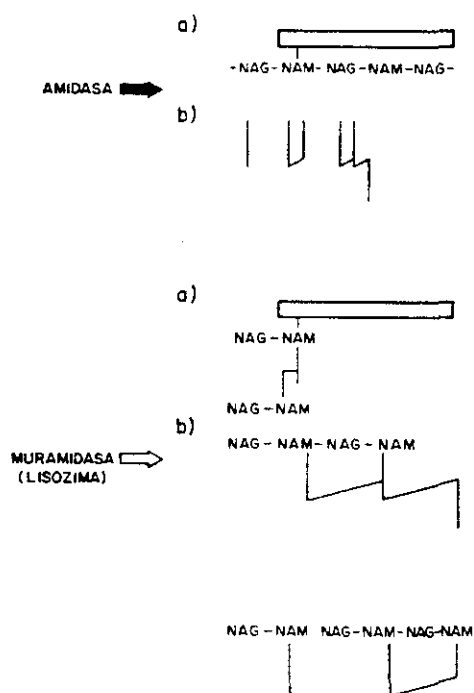


Figura 3. Modelo de la estructura de la pared celular de *S. pneumoniae*.

Panel A. Las cadenas glicánicas se representan con las letras G-M, que indican los residuos alternantes de *N*-acetilglucosamina (G) y ácido *N*-acetilmurámico (M). Los aminoácidos de las cadenas peptídicas se representan en código de tres letras según se indica en la Figura 1 A. ϵ , significa que el enlace peptídico se realiza con el grupo ϵ -amino de la L-lisina. El ácido teicoico de pared se simboliza con un rectángulo; las abreviaturas utilizadas son: P, grupo fosfato; GP, glicerolfosfato (existen dos o tres moléculas por cada molécula de ácido teicoico); GLU, glucosa; DATG, diacetamidotridoxigalactosa; NAGM, *N*-acetilgalactosamina; PCOL, fosforilcolina; RBT-P, ribitolfosfato. Se estima que hay, por término medio, 8 moléculas de PCOL en cada molécula de ácido teicoico. Los números 1 y 6 representan las posiciones de los átomos de carbono que participan en los enlaces que se indican. Los enlaces sensibles a la acción de las enzimas que hidrolizan la pared celular de neumococo se muestran con triángulos negros (sensibles a las amidasas), con triángulos blancos (sensibles a las muramidasa o lisozimas), y con flechas en zig-zag (sensibles a las glucosaminidasas).

B**Figura 3. (continuación)**

Panel B. Productos de degradación de la pared celular de neumococo cuando ésta se digiere con una amidasa (flecha negra) o con una muramidasa (flecha blanca). Los símbolos se corresponden con los detallados en el panel A. Las cadenas peptídicas se representan con trazos verticales y los puentes interpeptídicos con trazos oblicuos. Tomado de Tomasz (1981).

ácidos teicoicos de la pared celular de neumococo contenían colina en forma de fosforilcolina en su composición. Se ha propuesto (Jennings y cols., 1980) que los ácidos teicoicos de *S. pneumoniae* están compuestos de unidades repetidas de glucosa-tridesoxidiaminohexosa-*N*-acetilgalactosamina-galactosamina-ribitol fosfato. Los residuos de fosforilcolina se encontrarían situados en la posición O(6) de los residuos no acetilados de galactosamina y las unidades repetidas se unirían a través de un enlace fosfoéster entre el ribitol y el ácido murámico (figura 3A). El 85% de la colina presente en la célula se encuentra formando parte del ácido teicoico (Brundish y Baddiley, 1968; Mosser y Tomasz, 1970), estimándose que hay, por término medio, 8 unidades repetidas de fosforilcolina por cada molécula de ácido teicoico (García-Bustos y Tomasz, 1987). El 15% de la colina total se encuentra en el ácido lipoteicoico o antígeno de Forssman (Briles y Tomasz, 1973).

El requerimiento nutricional de *S. pneumoniae* por la colina puede satisfacerse mediante el empleo de análogos estructurales tales como la etanolamina (EA), la *N*-metiletanolamina y la *N,N*-dimetiletanolamina (Badger, 1944; Tomasz, 1968). Sin embargo, neumococo es incapaz de llevar a cabo la metilación de la etanolamina en los ácidos teicoicos cuando se cultiva en un medio que contiene este compuesto en lugar de colina (Tomasz, 1968); la sustitución de la colina por EA en la pared celular origina profundas alteraciones fisiológicas, tales como la no separación de las células hijas al final de la división celular (produciéndose un encadenamiento ilimitado), la resistencia a la lisis por detergentes y la no infección por fagos, etc...

Todas las anomalías fisiológicas mencionadas anteriormente pueden revertir fácilmente con la adición de colina al medio de cultivo en un momento en el que las células permitan la incorporación de este aminoalcohol a las unidades nacientes de ácido teicoico, tras lo cual la pared celular vuelve a ser un sustrato reconocido por las autolisinas y permite también el proceso de adsorción fágica.

A la hora de explicar estas alteraciones es preciso señalar que la incorporación de etanolamina a los ácidos teicoicos en lugar de colina no produce cambios significativos en la forma y composición química de la pared de neumococo, puesto que los productos de degradación producidos tras la digestión de estas paredes con la muramidasa del hongo *Chalara*

(= *Chaloropsis*) son los mismos tanto en el caso de que la pared contenga colina o etanolamina en su composición (Höltje y Tomasz, 1975b). Sin embargo, las paredes que contienen EA son resistentes a la degradación por las enzimas autolíticas de neumococo; la sensibilidad a la degradación puede ser restaurada tras metilación de los residuos de EA por yoduro de metilo, que los transforma en residuos de colina (Höltje y Tomasz, 1975b). Las células cuya pared contiene EA poseen una enzima autolítica denominada LYTA, en una conformación que posee una actividad muy reducida (forma E) pero que puede activarse ("convertirse") a la forma catalíticamente activa (forma C) tras preincubación de la misma a baja temperatura con paredes que contienen colina (Tomasz y Westphal, 1971).

2. ENZIMAS QUE DEGRADAN EL PEPTIDOGLICANO

2.1. Autolisinas bacterianas

Las enzimas autolíticas o autolisinas son enzimas sintetizadas por la propia bacteria que son capaces de hidrolizar el peptidoglicano de la pared y de producir eventualmente la lisis bacteriana (de ahí que durante algún tiempo se les llamase también "suicidasas"). Estas enzimas están presentes tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas, aunque también se han descrito en hongos y levaduras.

Existen cuatro tipos bioquímicamente diferenciables de enzimas autolíticas, que pueden clasificarse en:

i) *Muramidasa (enzimas tipo lisozima)*, que hidrolizan el enlace B-1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina, liberando grupos reductores de ácido N-acetilmurámico (figura 3B).

ii) *B-N-acetilglucosaminidasas (glucosaminidasas)*, que liberan grupos reductores de N-acetilglucosamina.

iii) *N-acetilmuramyl-L-alanil amidasa (amidasa)* que hidrolizan el enlace amida entre la cadena glicánica y el péptido (figura 3B).

iv) *Peptidasas*, que pueden hidrolizar alguno de los péptidos principales y los puentes interpeptídicos, siempre que éstos tengan lugar entre la D-alanina terminal y el grupo amino de una cadena peptídica contigua.

Un quinto grupo de actividad enzimática puede ser el representado por las transglicosidasas, las cuales liberan grupos no reductores de ácido N-acetilmurámico, aunque no se conoce todavía con certeza si funcionan como autolisinas *in vivo* (Goodell y Schwartz, 1985). Asimismo, las D-alanil-carboxipeptidasas, que rompen por el extremo C-terminal de los residuos D-alanilo del

peptidoglicano y que normalmente están presentes en varios organismos, no actúan como autolisinas.

El hecho de que las autolisinas bacterianas se presenten en una gran variedad de especies hace pensar que deben desempeñar funciones de gran importancia, aunque éstas son difíciles de estudiar puesto que estas enzimas no se purifican fácilmente, se sintetizan en muy pequeña cantidad, y en la mayoría de las bacterias existe más de una autolisina, lo que dificulta la asignación de propiedades específicas a cada una de ellas. Sin embargo, parece demostrada su importancia en procesos tales como la separación de las células hijas al final de la división celular y la liberación de la descendencia fágica (McDonnell y cols., 1975).

2.2. Enzimas líticas de bacteriófagos

Tras la infección fágica de una bacteria, y posterior replicación de su DNA, se hace necesaria la lisis de la pared bacteriana para la liberación de su descendencia. Con mucha frecuencia este proceso se lleva a cabo por enzimas líticas de pared codificadas por el propio fago. Se han descrito muchas enzimas líticas asociadas a fagos, pero sólo algunas han sido estudiadas en detalle.

2.2.1. Enzimas líticas de fagos que infectan a bacterias Gram-negativas

Los fagos de la familia T de *E. coli* codifican, en su mayoría, enzimas líticas que han sido bien estudiadas. El bacteriófago T4 es el único caso conocido de fago que lleva asociadas a la partícula fágica dos lisozimas (Szewczyk y cols., 1986). El bacteriófago T2 produce una lisozima cuya secuencia sólo se diferencia en 33 aminoácidos de una de las de T4 (Inouye y Tsugita, 1968). La enzima lítica del fago T7 es una amidasa (Inouye y cols., 1973) y las de los fagos T3 y T5 podrían tener actividades líticas similares (De Martini y cols., 1975). Algunas de estas enzimas, como la amidasa de T7, no se requieren para la lisis de la célula huésped, por lo que sus funciones reales se encuentran todavía en estudio. Una de las lisozimas del fago T4 ha sido cristalizada y su estructura determinada a partir de espectros de difracción de rayos X, como se verá más adelante.

Con respecto al fago lambda existen dos genes, S y R, implicados en la lisis celular (Garret y cols., 1990). El gen R codifica para una transglicosilasa específica del peptidoglicano de *E. coli*, aunque la lisis celular no tiene lugar en ausencia de la proteína S. Esta última ha sido implicada en procesos de interacción con la membrana plasmática (Blási y cols., 1989).

En el caso de otros bacteriófagos como ϕ X174 y MS2, la liberación de la progenie fágica al final del ciclo lítico depende de las autolisinas de *E. coli*. Tras la infección del fago ϕ X174, la lisis celular depende, además de la producción de la proteína del fago, de otros parámetros tales como la composición lipídica de la pared, la fuerza protón-motriz y la actividad del sistema autolítico (Witte y Lubitz, 1989). Un importante aspecto de la proteína codificada por ϕ X174 es que no posee actividad enzimática propia.

Por último, el bacteriófago PRD1, que infecta a una gran variedad de bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, posee una lisozima asociada que parece ser única entre las enzimas líticas fágicas, puesto que su estructura primaria no tiene similitud con ninguna otra (Pakula y cols., 1989). Por su parte, el fago P22 de *Salmonella* posee dos genes esenciales para la lisis de la pared celular bacteriana (Botstein y cols., 1972), una de ellas posee una gran similitud de secuencia con la proteína S del fago lambda, mientras que la otra, con actividad de lisozima, tiene cierto parecido con la lisozima de T4.

2.2.2. Enzimas líticas de bacteriófagos que infectan a bacterias Gram-positivas

Los bacteriófagos SF6 y ϕ 29 de *Bacillus subtilis* codifican para sendas lisozimas que han sido clonadas y secuenciadas (Verma, 1986; Garvey y cols., 1987). La lisozima de ϕ 29 presenta cierta similitud con la lisozima de P22 y algo menos con la de T4, pero sus características estructurales la hacen única entre las lisozimas fágicas (Saedi y cols., 1987). En la lisozima LysA, codificada por el fago mv1 de *Leptobacillus bulgaricus* (Boizet y cols., 1990), se reúnen dos funciones llevadas a cabo en otros sistemas por proteínas diferentes. Así (apartado 2.4), el extremo N-terminal de esta proteína presenta gran similitud con la muramidasa del hongo *Chalara*, la del bacteriófago Cp-1 de neumococo y la autolisina de *S. globisporus* (Lichenstein y cols., 1990), sugiriendo que esta parte de la molécula es la responsable de la actividad muramidásica. En cambio, el extremo

carboxi-terminal es similar a la proteína S de lambda, con lo que podría estar implicado en procesos de interacción con la membrana plasmática (Boizet y cols., 1990). Asimismo, se ha clonado y expresado un gen responsable de la lisis de la pared de *Lactococcus lactis* contenido en el genoma del fago LL-H (Trautwetter y cols., 1986). Además, se han descrito enzimas líticas asociadas a fagos en el caso de estreptococos del grupo A (A-PAL del fago A25) (Wheeler y cols., 1980) y estreptococos del grupo C (C-PAL del fago C1) (Hill y Wannamaker, 1981). Estas enzimas comparten muchas propiedades físico-químicas, aunque se diferencian en que la A-PAL sólo se ha detectado en forma libre y nunca asociada a las partículas fágicas como es el caso de la C-PAL (Fox y Wittner, 1965).

2.3. Las enzimas líticas de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos

En *S. pneumoniae* se han descrito hasta la fecha dos enzimas autolíticas, una N-acetilmuramil-L-alanil amidasa (amidasa LYTA) (Howard y Gooder, 1974), que fue la primera que se descubrió y que resultó ser mayoritaria en la célula, y una endo- β -1,4-N-acetilglucosaminidasa (Sánchez-Puelles y cols., 1986; García y cols., 1989). En cuanto a los bacteriófagos de *S. pneumoniae* se han podido caracterizar como amidasas las enzimas líticas de los fagos Dp-1, Ej-1 y HB-3, y como muramidasas las de los fagos Cp-1, Cp-7 y Cp-9.

2.3.1. La principal autolisina de neumococo (LYTA)

La amidasa LYTA fue purificada a homogeneidad electroforética por Hölte y Tomasz (1975b), quienes calcularon una M_r de 36.000. En 1985, García y cols. lograron clonar y expresar en *E. coli* el gen *lytA*, que codifica para dicha enzima. Este resultado constituyó, además de la primera clonación y secuenciación del gen de una autolisina bacteriana, el primer caso de expresión de un gen de neumococo en *E. coli*, demostrándose que el gen *lytA* codificaba para una proteína de 318 aminoácidos con una M_r de 36.532. La característica más relevante de esta proteína es que su actividad catalítica requiere la presencia de residuos de colina en los ácidos teicoicos de la pared de neumococo. Los residuos de colina actuarían como ligandos alostéricos que permitirían la adsorción de las moléculas de autolisina a un sustrato insoluble como es la pared, pudiendo situarse entonces correctamente para llevar a cabo la catálisis (Giudicelli y

Tomasz, 1984a). Cuando se sustituye la colina de la pared por su análogo estructural etanolamina, la amidasa LYTA es incapaz de hidrolizar la pared, produciéndose una serie de cambios drásticos en la morfología de *S. pneumoniae* (ver apartado 1.3). Una explicación a este hecho es que la amidasa no puede adsorberse a la pared celular. La metilación de los residuos de etanolamina sensibiliza la pared a la acción de la amidasa (Höltje y Tomasz, 1975b). Cuando las paredes de neumococo se solubilizan mediante la acción enzimática de la muramidasa M1 de *S. globisporus*, la amidasa LYTA es capaz de actuar sobre los muropéptidos resultantes tanto si contienen colina o etanolamina en los ácidos teicoicos (García-Bustos y Tomasz, 1987), lo que refuerza la hipótesis sobre el papel de la colina en los procesos de adsorción citados.

El aislamiento del mutante M31 de neumococo (Sánchez-Puelles y cols., 1986a), que contiene una delección completa del gen *lytA*, permitió asignar funciones específicas a la amidasa LYTA. El mutante M31 crece a 37°C en cadenas cortas y no se lisa en la fase estacionaria de cultivo ni en presencia de detergentes, al igual que las células con etanolamina en su pared celular. Además, este mutante exhibe una respuesta tolerante frente a los antibióticos β -lactámicos, confirmando la implicación de la amidasa en este fenómeno. Todas estas características revierten cuando se logra clonar y expresar en este mutante el gen *lytA* (Ronda y cols., 1987).

Recientemente se ha sugerido la existencia de un sitio de alta afinidad por colina en la amidasa LYTA (Markiewicz y Tomasz, 1990). La colina unida a este sitio no se libera mediante diálisis, precipitación con TCA o con sulfato amónico, o en el paso por columnas de filtración. Sin embargo, esta unión no parece tener lugar mediante enlaces covalentes, puesto que la colina puede liberarse mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS o por almacenamiento de la proteína a 0°C. Tampoco hay que descartar la existencia de otros sitios de más baja afinidad por este ligando.

2.3.1.1. El proceso de activación (conversión)

Como ya se dijo anteriormente, la amidasa LYTA se sintetiza en neumococo en una forma de baja actividad enzimática (forma E) que requiere un proceso de activación (conversión) para alcanzar el estado de máxima actividad (forma C) (Tomasz y Westphal, 1971). Este proceso

consiste en una interacción específica de la amidasa con los residuos de colina. En la célula, la colina utilizada para la conversión es la que se encuentra en los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared (Briese y Hakenbeck, 1985). Por esta razón, la forma C se aísla de neumococos crecidos normalmente en presencia de colina (conversión *in vivo*), mientras que la forma E pura puede aislarse de extractos de *S. pneumoniae* incubado en presencia de etanolamina en lugar de colina. Asimismo, es también la forma E la que se sintetiza a partir del gen clonado en *E. coli*. La conversión puede realizarse *in vitro* incubando a baja temperatura la forma E con paredes celulares que contengan colina quedando asociada la proteína a la pared (Tomasz y Westphal, 1971). Es posible realizar también la conversión con ácido lipoteicoico que contenga colina, o este mismo ligando libre o fosforilado en concentraciones alrededor de 150 mM (Briese y Hakenbeck, 1985). El proceso de reversión de la forma C a la forma E (desconversión) sólo puede alcanzarse después de una diálisis continuada (más de 20 días), lo que estaría de acuerdo con la hipótesis de la existencia de un sitio de muy alta afinidad por colina (Markiewicz y Tomasz, 1990).

2.3.1.2. Inhibición de la actividad catalítica de la amidasa LYTA

Las moléculas de colina libre en concentraciones superiores a 7 mM pueden interferir en el proceso de adsorción de la amidasa a la pared compitiendo con los residuos de colina de los ácidos teicoicos, e impidiendo de este modo la actividad catalítica sobre paredes celulares. Otros inhibidores de este tipo son el LTA que contiene colina y la fosforilcolina. Los compuestos análogos que contienen etanolamina no ejercen ningún efecto inhibitorio. Al resultar inhibida la actividad enzimática, la adición de estos compuestos a las concentraciones apropiadas puede originar *in vivo* los mismos efectos fisiológicos que resultan de sustituir la colina del medio de cultivo por etanolamina (Höltje y Tomasz, 1975a; Giudicelli y Tomasz, 1984a, b; Briese y Hakenbeck, 1985).

Briese y Hakenbeck (1985) han observado que la forma E de la enzima está presente sólo en el citoplasma, mientras que el resto se encuentra asociado a la membrana como forma C. En células que contienen etanolamina en sus ácidos teicoicos de pared, no se encuentra enzima transportada a través de la membrana. La enzima unida a membrana, como forma C, puede ser liberada completamente con colina, sugiriendo que la amidasa está unida a la membrana a través

del LTA en lugar de ser una proteína integral de membrana. Esto se ve apoyado por la ausencia de actividad amidásica en fracciones membranosas derivadas de neumococos incubados en presencia de etanolamina. El LTA podría actuar entonces como barrera topológica *in vivo*.

2.3.2. Características de la glucosaminidasa de neumococo

La ausencia total de amidasa LYTA en el mutante M31 de neumococo, que contiene una deleción absoluta del gen *lytA*, permitió detectar una segunda autolisina (Sánchez-Puelles y cols., 1986 b) con actividad de glucosaminidasa (García y cols., 1989) que se encuentra normalmente enmascarada por la autolisina LYTA en las cepas salvajes. Esta enzima, de alrededor de 64 kDa, ha sido purificada a homogeneidad electroforética, requiere la presencia de residuos de colina en la pared celular y se inhibe con LTA y colina, si bien no es reconocida por el antisuero frente a la amidasa LYTA (García y cols., 1989). Su actividad se triplica cuando se ensaya *in vitro* a 30°C en lugar de a 37°C, y de hecho, cuando el mutante M31 se cultiva a 30°C hay autólisis al final de la fase estacionaria y desaparece el encadenamiento celular (Sánchez-Puelles y cols., 1986b). Además, las cadenas formadas por el mutante M31 incubado a 37°C no son tan largas como las formadas por la cepa salvaje incubada en presencia de etanolamina en lugar de colina. Estos hechos indicarían que la glucosaminidasa poseería una cierta actividad lítica importante a esa temperatura.

2.3.3. Enzimas líticas de bacteriófagos que infectan a *S. pneumoniae*

La primera enzima lítica fágica capaz de hidrolizar la pared celular de neumococo que fue aislada y purificada a homogeneidad electroforética fue la codificada por el fago Dp-1, y recibió el nombre de PAI (Phage-Associated Lysin) (García y cols., 1983a). Esta enzima tiene una M_r de aproximadamente 31.000 y se ha caracterizado como una N-acetilmuramil-L-alanil amidasa (García y cols., 1984). Al igual que la amidasa LYTA, para llevar a cabo su acción catalítica requiere la presencia de residuos de colina en la pared y se inhibe en presencia de LTA. Sin embargo, a diferencia de aquélla, su actividad *in vivo* e *in vitro* se estimula por agentes reductores como el DTT o el β -mercaptoetanol (García y cols., 1983a, b, c), además de inhibirse parcialmente por cardiolipina y no dar reacción inmunológica cruzada con la forma E de la

amidasa LYTA, aunque sí con la forma C (García y cols., 1984). Por último, se ha demostrado que esta enzima interviene activamente en la liberación de la descendencia fágica en mutantes de neumococo que carecen de amidasa LYTA, por lo que ambas enzimas participan en la liberación de la progenie fágica (García y cols., 1983b, c).

La siguiente enzima fágica con actividad sobre paredes de neumococo que se logró caracterizar fue la muramidasa codificada por el bacteriófago Cp-1 (CPL1). (García y cols., 1987). Su peso molecular se estimó en 39 kDa, comparte con la LYTA la dependencia de colina en la pared y su actividad se inhibe asimismo con colina libre y LTA, aunque no requiere el proceso de conversión para alcanzar la máxima actividad catalítica. El gen *cpl1*, que codificaba para esta lisozima, fue clonado y expresado en *E. coli* y se determinó la secuencia de nucleótidos del gen, con lo que pudo deducirse la secuencia de aminoácidos de la proteína. De este análisis se comprobó que esta muramidasa tendría 339 aminoácidos ($M_r = 39.146$). Un estudio comparativo con la amidasa de la célula huésped reveló la homología existente entre la región 3' de este gen y la región 3' del gen *lytA* de *S. pneumoniae* (García y cols., 1988).

Utilizando como sonda el gen *cpl1* se procedió a la clonación y secuenciación de los genes *cpl7* y *cpl9* de los fagos Cp-7 y Cp-9, respectivamente (García y cols., 1990). La lisozima CPL9 sólo se diferencia de la CPL1 en 10 aminoácidos. Sin embargo, las mayores diferencias surgen de la comparación de la lisozima CPL7 con la CPL1. La lisozima CPL7 tiene una M_r de 38.461 (342 aminoácidos) y su actividad catalítica no depende de la presencia de residuos de colina en la pared. Esta importante característica posibilita que el fago Cp-7 pueda lisar y liberar la descendencia en células de neumococo que posean etanolamina o colina en los ácidos teicoicos de pared, sin la cooperación de las autolisinas bacterianas (García y cols., 1990).

La metodología empleada para la clonación de los genes de las enzimas líticas de los fagos Cp se utilizó también para clonar el gen *hbl* que codifica para la enzima lítica de pared del bacteriófago HB-3 (HBL), un fago atemperado de *S. pneumoniae* (Romero y cols., 1990a). La enzima HBL es una amidasa, tiene una M_r de 36.000 y sus propiedades inmunológicas y bioquímicas son muy similares a las de la amidasa LYTA (Romero y cols., 1990a). La secuencia de

aminoácidos de la amidasa HBL, deducida de la secuencia de nucleótidos del gen, confirmó la existencia de homología con el gen LYTA (Romero y cols., 1990b).

La construcción de genotecas de la cepa de *S. pneumoniae* 101/87 permitió el aislamiento y clonación del gen *ejl*, que mostraba similitud con el gen *lytA* (Díaz, 1991). Este gen codifica para la enzima Ejl, de 316 aminoácidos, que es una amidasa convertible 9 a 12 veces menos activa que la amidasa LYTA. La enzima Ejl está codificada por el fago lisogénico EJL-I aunque es inactiva en la cepa 101/87 durante el ciclo lisogénico (Díaz, 1991). La secuenciación del gen *ejl* permitió comprobar la similitud de las secuencias de aminoácidos de la enzima Ejl y la amidasa LYTA. Sin embargo, la característica más importante que las diferencia es el hecho de que el proceso de recuperación del estado de baja actividad catalítica (desconversión) por diálisis es notablemente más rápido en el caso de la proteína Ejl.

2.4. Estructura modular de las enzimas líticas de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos

Como hemos visto anteriormente, todas las enzimas líticas de neumococo y sus bacteriófagos, a excepción de la lisozima del fago Cp-7, requieren la presencia de colina en los ácidos teicoicos de pared para llevar a cabo su actividad enzimática. Asimismo, todas estas enzimas son capaces de producir el efecto denominado como curación fenotípica por el cual, cuando se añaden de forma exógena a cultivos de mutantes de *S. pneumoniae* deficientes en amidasa LYTA (*lyt⁻*), se obtiene como resultado la autólisis de los cultivos en la fase estacionaria de crecimiento y la lisis inducida por detergentes, procesos que no ocurren en ausencia de estas enzimas. La afinidad por colina que presenta la mayoría de estas proteínas se ha aprovechado para su purificación en un sólo paso mediante cromatografía de afinidad en columnas de Sepharosa-colina (Briese y Hackenbeck, 1985). Además, su actividad enzimática se inhibe en presencia de colina libre, como se ha demostrado en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las enzimas líticas de neumococo y sus bacteriófagos ha puesto de manifiesto una serie de peculiaridades estructurales que hacen de estas enzimas un modelo muy interesante para establecer relaciones evolutivas entre ellas, y constituye un nuevo ejemplo a favor de la teoría modular de la evolución de las proteínas (García

y cols., 1988; García y cols., 1990). Como puede verse en la figura 5, el análisis de sus estructuras primarias revelan la existencia de dos posibles módulos funcionales en todas estas proteínas. El módulo N-terminal sería el responsable de la actividad catalítica de estas enzimas, puesto que se conserva con ligeras variaciones en todas aquellas enzimas con la misma especificidad enzimática, como las lisozimas CPL1, CPL7 y CPL9 por un lado, y las amidasas LYTA, HBL3, EJL y LYTA101 (Díaz, 1991) por otro. Además, otras enzimas heterólogas como las lisozimas de *Chalara* (Fouche y Hash, 1978), *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Croux y García, 1991), *S. globisporus* (Lichenstein y cols., 1990), y la del fago mvi de *L. bulgaricus* (Boizet y cols., 1991) tienen semejanza en su secuencia N-terminal con las lisozimas de los fagos Cp (figura 4). Los dos aminoácidos implicados en el mecanismo catalítico de la lisozima de *Chalara* se conservan en la misma posición y a la misma distancia en todas estas lisozimas.

En cuanto a la región C-terminal, se conserva en las enzimas dependientes de colina, es decir, en todas excepto en la lisozima del fago Cp-7. De los 142 residuos del dominio C-terminal de la amidasa LYTA, 73 son idénticos a los del dominio C-terminal de la lisozima CPL1, y de las 69 sustituciones, 55 son cambios conservativos (García y cols., 1988). Estos datos refuerzan la hipótesis según la cual es la región C-terminal la encargada del reconocimiento de los residuos de colina de la pared celular.

Una evidencia de que los módulos N- y C-terminales podrían constituir dominios estructurales independientes dentro de las enzimas líticas la constituyen los resultados obtenidos tras la obtención de enzimas híbridas en las que se han intercambiado los distintos módulos entre sí (figura 5) (Díaz y cols., 1990; Díaz y cols., 1991). Como resultado, las proteínas quiméricas resultantes adquieren las propiedades características de los módulos que las componen.

Un estudio más profundo a nivel de secuencia revela que todos los dominios C-terminales con funcionalidad de unión a colina están constituidos por motivos de secuencias repetidas con gran similitud entre sí en composición de aminoácidos, que se pueden considerar como unidades modulares surgidas por duplicación génica de una secuencia original (García y cols., 1988). En el caso de las enzimas LYTA, LYTA101, HBL3, EJL, CPL1 y CPL9 existen 6 motivos de, aproximadamente, 20 aminoácidos cada uno. Por comparación con los motivos de la amidasa

```

CPL VKKNDLFVDYSSHHGYDITGILEQMGTNTIIKISESTTYLNPCLSAQVE
CAC MKGIDIIYSGQGSVDFNAVKESQVEVVYIKATEGLTYYTDSTYKDFYD
SGL DTSGVQGIDYSHWQGSINWSSVKSAQMSPAYIKATEGTNYKDDRFSANYT
CHA TVQGFDISSYQPSYNFAGAYSAGARFVLIKATEGTSYTNPSFSSQYN
MV1 TKT-YGVVDYAVYQP-IDLAAHYKAGASFALVRLTEGVVDYVNRGRPSRWT
T4L MN--IFEMLRIDEGRLRLIKYKDEG-YPTIGIGHLLTK

```

FIGURA 4. Comparación de las secuencias N-terminales de diversas enzimas líticas. Las enzimas mostradas son: CPL, lisozima CPL1; CAC, lisozima de *C. acetobutylicum* ATCC 824; SGL, lisozima de *S. globisporus*; CHA, lisozima de *Cholera*; MV1, lisozima del fago mv1 de *L. bulgaricus*; T4L, lisozima del fago T4 de *E. coli*. En cursiva y subrayado se señalan los aminoácidos más conservados en las secuencias de las proteínas. En negrita se muestran los aminoácidos que han sido implicados en el centro activo de cada una de las enzimas.

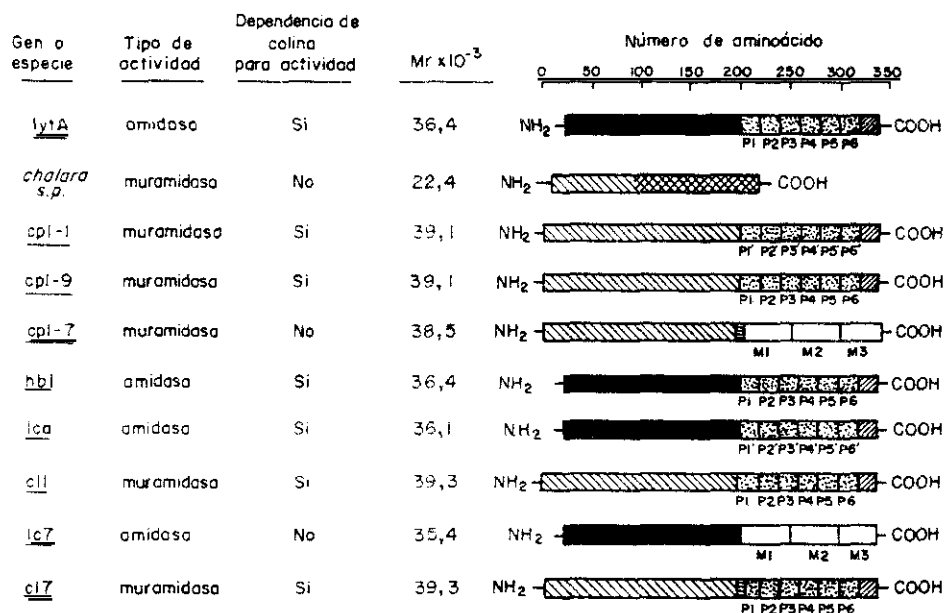


FIGURA 5. Comparación de las propiedades más relevantes y representación esquemática de las enzimas líticas de neumococo y sus bacteriófagos, además de la lisozima de *Chalara*. Las zonas de igual sombreado indican un alto grado de similitud. P1 a P6, P1' a P6' y M1 a M3 representan las secuencias repetidas (motivos) de los dominios C-terminales de las enzimas.

LYTA y la lisozima CPL1 se obtuvo la secuencia consenso GWVKIGDGWYYFDNSGAMATN (García y cols., 1988). Sin embargo, el módulo C-terminal de la lisozima CPL7 está constituido por 2,8 motivos de 48 aminoácidos cada uno, diferentes de los arriba descritos pero idénticos entre sí (García y cols., 1990), lo cual revelaría, de acuerdo con Doolittle (1986) que, para este caso concreto, el proceso de duplicación génica habría tenido lugar recientemente en términos evolutivos. Sólo en algunos casos ha podido demostrarse experimentalmente la relación entre la existencia de motivos repetidos y la función que desempeña la proteína que los contiene, como ocurre por ejemplo con las proteínas que se unen al DNA (Klug y Rhodes, 1987). La razón por la que los dominios C-terminales de las enzimas liticas de la pared de neumococo se han originado por repetición de motivos se desconoce, aunque se puede especular con la posibilidad de que estas repeticiones estén en relación con el hecho de que las enzimas están actuando sobre un sustrato polimérico constituido también por estructuras químicas repetidas (Saedi y cols., 1987). En la actualidad se conocen otras proteínas que también actúan sobre sustratos poliméricos y que contienen repeticiones en las regiones implicadas en el reconocimiento del sustrato. Entre ellas destacan: la lisozima del fago $\phi 29$ que infecta a *B. subtilis* (Garvey y cols., 1986), la endoglucanasa E de *C. thermocellum* (Hall y cols., 1988), un celulasa (Avicelasa I) de *C. stercorarium* (Jauris y cols., 1990), las glucosiltransferasas de *S. mutans* (Shiroza y cols., 1987; Ueda y cols., 1987) y de *S. downei* (Ferretti y cols., 1987; Gilmore y cols., 1990), y una proteína de unión a glucanos de *S. mutans* (Banas y cols., 1990). También se han descrito toxinas de *C. difficile* capaces de reconocer pequeñas estructuras poliméricas que presentan módulos repetidos en su molécula (Dove y cols., 1990; Bartoso y cols., 1990).

3. LAS LISOZIMAS

Las lisozimas (EC 3.2.1.17) se definen como 1,4-*N*-acetilmuramidasa, es decir, enzimas que son capaces de hidrolizar el enlace entre el carbono 1 del ácido *N*-acetilmurámico y el carbono 4 de la *N*-acetilglucosamina del peptidoglicano bacteriano. Las lisozimas son enzimas presentes en muy diversas especies, e históricamente han presentado un interés especial: la lisozima de clara de huevo (HEWL) fue la primera proteína que fue secuenciada y que tenía los veinte aminoácidos usuales, además de ser también la primera de la que se obtuvo un análisis cristalográfico completo y de la que se propuso un mecanismo de reacción detallado. Puesto que además se conocen las secuencias de aminoácidos de una gran variedad de estas enzimas, las lisozimas constituyen un sistema modelo desde los puntos de vista estructural, funcional y evolutivo.

3.1. Tipos de lisozimas

De acuerdo con Jollès y Jollès (1984), las lisozimas se pueden clasificar en los siguientes tipos:

1.- *Lisozimas tipo c ("chicken-type")*. Aunque las lisozimas más representativas de este tipo se encuentran en la clara de huevo de ciertas aves (pollo, pato) aquí también se pueden englobar las lisozimas de leche humana, de rata, etc... Todas ellas poseen alrededor de 130 aminoácidos ($M_r \approx 14.000$), con cuatro puentes disulfuro. Además, los dos aminoácidos ácidos supuestamente implicados en el mecanismo catalítico de la lisozima HEWL (Glu-35 y Asp-52) se conservan en todas las enzimas de esta clase en posiciones similares. Poseen una cierta actividad de quitinasa, lo que posibilita la hidrólisis de polímeros compuestos únicamente de NAG.

2.- *Lisozimas tipo g ("goose-type")*. Esta clase de lisozimas tienen unos 185 aminoácidos ($M_r \approx 21.000$), y no dan reacción inmunológica cruzada con las de tipo c. También poseen cuatro puentes disulfuro, y se ha postulado, en base a estudios de homología de secuencia apoyados en datos cristalográficos, que los aminoácidos Glu-73 y Asp-86 podrían corresponder a los Glu-35 y Asp-52 de la HEWL.

3.- *Lisozimas de bacteriófagos.* El ejemplo más representativo lo constituye la lisozima codificada por el bacteriófago T4 (T4L). Esta lisozima tiene 164 aminoácidos ($M_r \approx 18.700$) y su secuencia no es homóloga con las de las enzimas de tipo c; Se ha descrito la posibilidad de que los aminoácidos Glu-11 y Asp-20 podrían cumplir las funciones de los correspondientes Glu-35 y Asp-52 de la HEWL. Existen otras lisozimas de fagos que no entrarían dentro de esta clasificación.

4.- *Lisozimas de bacterias y hongos.* La enzima lítica producida por el hongo *Cholera* (lisozima Ch), además de ser una muramidasa, posee actividad de 8-1,4-N-(6-O-diacetil)muramidasa, por lo que es capaz de hidrolizar las paredes de *S. aureus*. Su secuencia y tamaño ($M_r \approx 22.400$) difieren del resto de lisozimas conocidas aunque, de modo similar a éstas, también se ha postulado la existencia de dos aminoácidos ácidos en el centro activo (Asp-6 y Glu-33) (Fouche y Hash, 1978). Las lisozimas de *S. globisporus* (Lichenstein y cols., 1990) y de *C. acetobutylicum* (Croux y García, 1991), la enzima lítica codificada por el bacteriófago mv1 de *L. bulgaricus* (Boizet y cols., 1990) y las enzimas codificadas por los bacteriófagos Cp-1 (García y cols., 1987) y Cp-7 (García y cols., 1990) de *S. pneumoniae*, por homología de secuencia, también pueden incluirse en este apartado.

3.2 Mecanismo de acción de las lisozimas

La cristalización de complejos de la lisozima HEWL con oligosacáridos análogos de sustrato, especialmente con tri-N-acetilglucosamina (tri-NAG), posibilitó en los años 60 el primer estudio exhaustivo de la estructura de una enzima mediante técnicas de difracción de rayos X (DRX). Dicho estudio sentó las bases para una elaboración posterior de un modelo de mecanismo de reacción, propuesto por Blake y cols. en 1967. Según este estudio, la lisozima es una proteína estructurada en dos dominios atravesada en su superficie por una hendidura que acomoda a la cadena de peptidoglicano. Esta cavidad tendría seis sitios para la unión del sustrato (denominados de A a F), en cada uno de los cuales se situaría una unidad de azúcar. El trimero anteriormente citado de N-acetilglucosamina forma seguramente un complejo enzima/sustrato no productivo a las concentraciones utilizadas para la formación de cristales, puesto que la hidrólisis de este compuesto tiene lugar muy lentamente en estas condiciones. Del análisis de este

complejo se deduce que son ocupados los sitios A, B y C, donde los residuos de azúcar establecen varios enlaces de hidrógeno con los aminoácidos que componen la cavidad. Un teórico cuarto residuo de NAG sólo podría acomodarse en el sitio D admitiendo una distorsión de la conformación "en silla" habitual hacia una conformación en "media silla" en la cual el carbono 6 se encontraría en posición axial. Los sitios E y F podrían acomodar residuos de NAG sin mayor dificultad.

El estudio detallado de la geometría de los subsitos de unión del sustrato indica como única posibilidad el acoplamiento de los residuos de NAM en los sitios B, D y F, en donde no existiría impedimento estérico a la hora de acomodar las cadenas relativamente voluminosas de ácido láctico. Puesto que la lisozima es una muramidasa, la hidrólisis debe proceder entre los sitios B y C, o bien entre D y E. Esta hipótesis se vio reforzada por los experimentos de Rupley y cols. (1967) en los que se mostraba que la lisozima hidrolizaba hexámeros de NAG rindiendo como productos un tetrámero y un dímero. La hidrólisis entre D y E parece mucho más probable según el análisis del entorno aminoacídico, mucho más reactivo que en el primer caso.

Una característica muy importante de la zona que circunda los sitios D y E, donde se ubicaría el enlace glicosídico susceptible de hidrólisis, es la presencia de dos aminoácidos ácidos, el Glu-35 y el Asp-52. La cadena lateral del Glu-35 se encuentra en un entorno predominantemente apolar, lo que favorecería su protonación incluso a pHs superiores al pK_a teórico del grupo -carboxilo de este residuo. Por su parte, el Asp-52 permanece en un entorno polar, tendiendo a mantener su grupo carboxilo ionizado. Los experimentos de titulación realizados por Parsons y Raftery (1972), seguidos de otros realizados con técnicas más precisas, sugieren unos valores de pK_a de aproximadamente 4.5 para el Asp-52 y de 6 para el Glu-35, lo que confirmaría la hipótesis sobre el estado de ionización de estos grupos al pH óptimo de actuación de la enzima, como se verá más adelante.

Teniendo en cuenta estos datos, Blake y cols (1967) postularon el siguiente mecanismo de reacción (figura 6):

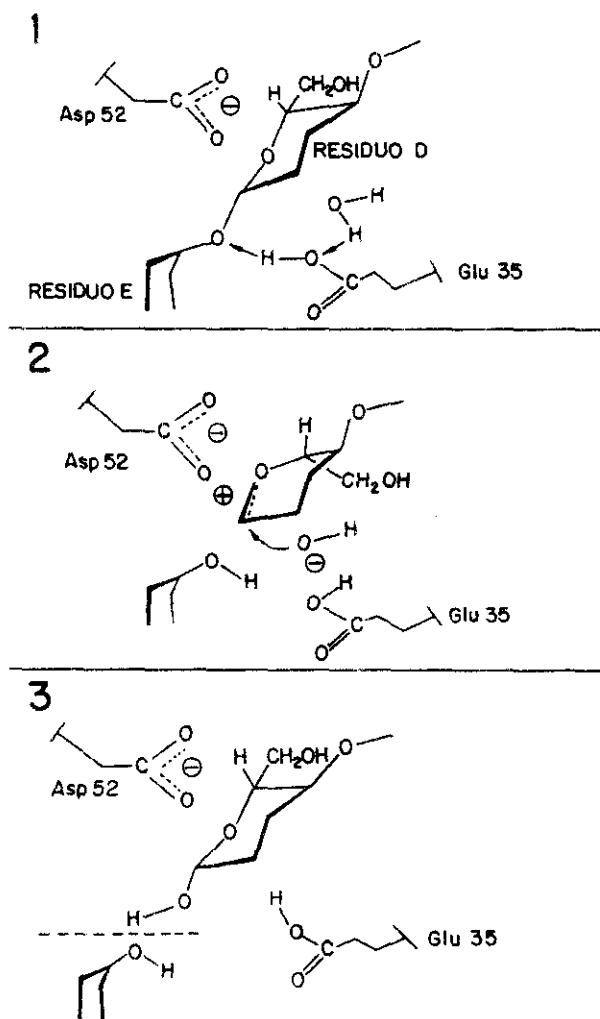


FIGURA 6. Mecanismo de reacción propuesto para la HEWL

1.- Una vez unido el sustrato, el Glu-35 podría actuar como un catalizador ácido-base general, cediendo el protón de su grupo carboxilo al oxígeno 4 del residuo de NAG situado en el subsitio E. De este modo, se crearía una carga positiva sobre el carbono 1 del NAM situado en el subsitio D.

2.- Este carbocatión intermedio podría estabilizarse en cierto modo por: a) deslocalización de carga con el oxígeno 5 del anillo, facilitada por la distorsión de éste creada tras la unión al subsitio D, como ya se había mencionado (de modo que la unión del sustrato, por sí misma, contribuye fundamentalmente al proceso catalítico) y b) cercanía del Asp-52 cargado negativamente que actuaría como contraión. De este modo, la energía de activación para la formación de este complejo intermedio quedaría rebajada sustancialmente.

3.- El último paso de la reacción lo llevaría a cabo una molécula de agua, reaccionando con el carbocatión y cediendo un protón que acabaría recuperando el Glu-35.

3.3. Papel biológico de las lisozimas

Las lisozimas son enzimas presentes en una gran variedad de organismos desde los bacteriófagos hasta los mamíferos superiores. Sin embargo, el papel biológico de las lisozimas aún no se conoce bien, a pesar de la multitud de estudios que se han realizado de estas proteínas. Solamente parece clara la función de defensa del organismo contra la infección bacteriana. Las lisozimas en invertebrados pueden servir quizá como un sistema rudimentario de protección, puesto que estos organismos no producen inmunoglobulinas (Schindler y cols., 1977). Las lisozimas de algunas plantas como la papaya actúan principalmente como quitinasas, posiblemente debido a que estas plantas crecen en lugares propensos al crecimiento de hongos, muchos de los cuales poseen quitina en sus paredes celulares (Schindler y cols., 1977).

Las lisozimas existen en altas concentraciones en la clara de huevo de varias aves (lisozimas c y g). Aunque estos organismos poseen sistemas inmunológicos, el huevo y el embrión no producen inmunoglobulinas hasta 7 días antes de la eclosión, por lo que es posible que el papel de

estas lisozimas sea la protección contra la infección bacteriana hasta que el embrión pueda hacer uso de su sistema inmunológico.

La función que pueden desempeñar las lisozimas en los vertebrados superiores no está clara. La lisozima y las inmunoglobulinas muestran una distribución similar en varios fluidos corporales. El papel de la lisozima como agente antibacteriano puede estar relacionado directamente con su acción bacteriolítica. Así, la fagocitosis llevada a cabo por los macrófagos alveolares de rata sólo puede realizarse contra bacterias cuya pared ha sido previamente degradada con lisozima (Biggar y Sturgess, 1977). Sin embargo, parece ser que es necesaria una interrelación con otros componentes para alcanzar la máxima efectividad en los mecanismos de defensa (Adinolfi, 1981).

4. OBJETIVOS

El gen *cplI*, que codifica para la lisozima CPLI, fue clonado y expresado en *E. coli* gracias al trabajo de García y cols. en 1987. Aunque algunos datos bioquímicos de la lisozima se obtuvieron en el trabajo original, las peculiares características de esta enzima y el hecho de que fuera una lisozima la convertían en un atractivo candidato para un estudio estructural, funcional y evolutivo más exhaustivo. Para ello se precisaba poner a punto un sistema que permitiera una alta producción de proteína, así como un método de purificación rápido que no adoleciera de los inconvenientes del procedimiento que utiliza la Sepharosa-colina, como son su difícil regenerabilidad y su alto coste.

La lisozima CPLI es una enzima que requiere la presencia de colina en la pared celular de neumococo para llevar a cabo la hidrólisis de ésta. Dada la importancia de la interacción con este ligando nos propusimos obtener la mayor cantidad posible de datos para su caracterización.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de la lisozima CPLI y de la amidasa LYTA sugiere la estructuración de estas enzimas líticas en dos dominios o módulos, el N-terminal responsable de la especificidad enzimática y el C-terminal encargado del proceso de reconocimiento de los residuos de colina de la pared (García y cols., 1988). El estudio de los dominios por separado permitiría no sólo la asignación de funciones a los dominios sino también la aportación de pruebas de la conservación de dichas funciones con independencia de la existencia del otro dominio.

La comparación de las secuencias de las regiones N-terminales de las lisozimas CPLI, CPL7 y CPL9 con la región N-terminal de la lisozima de *Chalara* (García y cols., 1988; García y cols., 1990) mostró la conservación en posiciones similares de dos aminoácidos, Asp-9 y Glu-36, que se ha sugerido que están implicados en el centro activo de esta última enzima (Fouche y Hash, 1978). Por ello nos propusimos estudiar la implicación de estos residuos en el mecanismo catalítico de la lisozima CPLI.

La construcción de proteínas de fusión constituye una de las técnicas más versátiles para la inmovilización y/o purificación de proteínas. La afinidad del dominio C-terminal de las murein hidrolasas de neumococo por el aminoalcohol colina le convierte en un candidato para su utilización en la construcción de proteínas de fusión de interés biotecnológico que pudieran purificarse aprovechando la interacción específica del dominio por su ligando.

Por todo ello, los objetivos de esta Tesis son los siguientes:

I) Puesta a punto de un método de obtención de lisozima CPL I.

- i) Construcción de un sistema que posibilite la alta producción de enzima.
- ii) Puesta a punto de un nuevo proceso de purificación.

II) Caracterización de la interacción de la lisozima CPL I con colina.

- i) Estudios de la interacción con análogos estructurales de colina.
- ii) Estudio de los cambios conformacionales inducidos por el ligando.

III) Estudio de la estructuración en dominios de la lisozima CPL I.

- i) Obtención mediante Ingeniería Genética de los dominios N- y C-terminales.
- ii) Asignación de funciones a estos dominios.
- iii) Estudio de la conformación de los dominios en la lisozima CPL I.

IV) Obtención de datos sobre el mecanismo de reacción enzimática.

- i) Mutagénesis dirigida de los residuos presumiblemente implicados en el centro activo.

V) Aplicaciones biotecnológicas de las murein hidrolasas de neumococo y sus bacteriófagos.

- i) Construcción de fusiones de proteínas de interés biotecnológico con los dominios C-terminales responsables de la interacción con colina.
- ii) Purificación en un solo paso de las proteínas de fusión.

II MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTIRPES BACTERIANAS, BACTERIOFAGOS Y PLASMIDOS

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron las estirpes bacterianas, los bacteriófagos y los plásmidos que se detallan en la Tabla I.

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas se conservaron congeladas a -70°C en medio de cultivo al que se añadió glicerol al 10% (v/v). En el momento de sembrarlas se descongelaron, incubándose en los medios correspondientes a 37°C , a menos que se indique lo contrario, con agitación para las cepas de *E. coli* y sin agitación para las cepas de *S. pneumoniae*.

2.1. *S. pneumoniae*

Para el cultivo de *S. pneumoniae* se utilizó el medio C+Y, que consiste en medio CptH8 (Tomasz y Hotchkiss, 1964) suplementando con extracto de levadura 0.08% (p/v) (Difco). Las cepas de *S. pneumoniae* que contienen en sus ácidos teicoicos residuos de etanolamina en lugar de residuos de colina se obtuvieron prolongando el cultivo de la cepa correspondiente durante más de 10 generaciones en un medio definido (Cden) utilizando el aminoalcohol etanolamina en lugar de colina (medio Cden-EA) (Tomasz, 1964). El crecimiento de *S. pneumoniae* se siguió por nefelometría con el empleo de un Nefelómetro Coleman modelo 9, calibrado para conteo de viables en neumococo $[N] = 7,5 \times 10^5$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml].

2.2. *E. coli*

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó el medio LB descrito por Sambrook y cols. (1989), añadiendo agar al 1% (p/v) para cultivos en medio sólido. Las cepas de *E. coli* RB791 y DH1 portadoras del plásmido pINIII-(lppP-5)-A3 y derivados de éste se cultivaron en medio LB al que se añadió lactosa al 2% (p/v). En estas condiciones la lactosa actúa como un inductor de la expresión génica regulada por el promotor-operador del gen *lacZ*.

TABLA I. Cepas bacterianas, plásmidos y bacteriófagos

Cepa, plásmido o bacteriófago	Genotipo o fenotipo relevante	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH1	<i>hsd</i> (r^- , m^-), <i>recA1</i>	Low, 1968
JM83	<i>lacZ</i> ΔM15 (r^+ , m^+)	Messing, 1983
MC1060	Δ(<i>lacI</i> POZYA)X74, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>strA</i> ⁺ , <i>hsdR</i> ⁻	Casadaban y cols., 1983
MC1116	Δ(<i>lacI</i> POZYA)X74, Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>), <i>recA</i> 56	Casadaban y cols., 1983
TG1	F' (<i>lacK</i> <i>lacZ</i> ΔM15)	Gibson, 1984
RB791	W3110 <i>lacK</i>	Brenz y Ptashne, 1981
HB101	r_B^- , m_B^- , <i>recA</i> 13	Boyer y Rouland-Dussoix, 1969
<u>Plásmidos:</u>		
pUC18	Ap ^R	Messing, 1983
pUC4K	Ap ^R , Kan ^R	Vieira y Messing, 1982
pINIII-(<i>hpp</i> ^P -5)-A3	Ap ^R	Inouye e Inouye, 1985
pMC931	Ap ^R , Kan ^R , <i>lacZ'</i> YA	Casadaban y cols., 1983
pMC1871	Tc ^R , <i>lacZ'</i>	Casadaban y cols., 1982
pCE17	Ap ^R , <i>c-lytA</i>	Sánchez-Puelles y cols., 1990
pCIP50	Ap ^R , Tc ^R , <i>cpl1</i>	García y cols., 1987
pCIP51	Tc ^R , <i>cpl1</i>	Sánchez-Puelles y cols., 1990
pCIP54	Tc ^R , <i>cpl1</i> -209	Díaz y cols., 1990.
pTc88BS	Ap ^R , TcR88.1	Santiago Rodríguez, com. personal

TABLA I. (continuación)

Cepa, plásmido o bacteriófago	Genotipo o fenotipo relevante	Referencia
<i>S. pneumoniae</i>		
R6	cepa silvestre	Rockefeller University
M31	Hex ⁻ , Δ lytA	Sánchez-Puelles y cols., 1986b
<i>Bacteriófagos</i>		
M13tg130		Kieny y cols., 1983
M13tg131		Kieny y cols., 1983

La concentración de antibiótico añadida al medio LB para el cultivo de cepas resistentes fue de 100 $\mu\text{g/ml}$ para la ampicilina, 10 $\mu\text{g/ml}$ para la tetraciclina, 25 $\mu\text{g/ml}$ para la kanamicina y 20-30 $\mu\text{g/ml}$ para el cloranfenicol. El crecimiento de las cepas de *E. coli* se siguió por turbidimetría a 550 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UV-260.

3. CURACION FENOTIPICA DE NEUMOCOCO

Los experimentos de curación fenotípica de las cepas de neumococo Lyt^- se realizaron como se describe en Tomasz y Waks (1975). La curación consiste en la adición de una enzima hidrolítica de la pared celular de neumococo a un cultivo de una cepa Lyt^- en fase exponencial temprana de crecimiento. Se dice que dicha cepa se ha curado cuando ésta sufre la autólisis al alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, un comportamiento similar al que experimenta una cepa Lyt^+ de forma natural.

En los experimentos de curación fenotípica realizados en esta Tesis se ha utilizado la cepa de neumococo M31, un mutante que carece del gen *lytA* (Sánchez-Puelles y cols., 1986a), cultivada a 37 °C en medio C+Y. A esta temperatura de incubación la autolisina minoritaria de neumococo, la glucosaminidasa, presenta una baja actividad y el fenotipo de la cepa M31 es Lyt^- (apartado 2.3.1 de la Introducción).

4. PROCEDIMIENTOS DE TRANSFORMACION GENETICA

Las cepas de *E. coli* se transformaron con el método del RbCl (Kushner, 1978).

5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS DE CULTIVOS CELULARES

Para obtener extractos crudos de las cepas de *E. coli*, en un experimento típico se cultivaron éstas en 100 ml del medio indicado en cada caso a 37°C durante 16 horas (fase estacionaria de crecimiento). A continuación, los cultivos se enfriaron a 4°C y se centrifugaron a 6.000 $\times g$ durante 10 minutos, resuspendiéndose las células en 6 ml de tampón Tris-maleato 50 mM, pH 6,5 (tampón TM) o fosfato sódico 20mM pH 7,0 (tampón fosfato). Una vez

homogeneizada la suspensión, las células se rompieron en un sonicador MSE modelo MK2 mediante cuatro pulsos de 15 segundos cada uno, manteniendo siempre la muestra a 4°C. Finalmente, la suspensión sonicada se centrifugó a 4°C y 10.000 x g durante 10 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante de esta centrifugación (extracto crudo) se conservó a -20°C. La concentración de proteína en el extracto se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando la curva patrón de la seroalbúmina bovina. Cuando se cultivaron volúmenes mayores, las células se rompieron usando una "French-press" (American Instruments Company) operando a una presión de 7,6 atmósferas.

6. TECNICAS DE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR EN *E. coli*

6.1. Fraccionamiento subcelular mediante choque osmótico

El choque osmótico de los cultivos de la cepa *E. coli* HB101 [pCIP50] se realizó como se describe en Nossal and Heppel (1966). Para ello, se cultivó dicha cepa en 25 ml de medio LB con ampicilina hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm de 0,5 (fase exponencial media). Las células del cultivo se concentraron mediante centrifugación, se resuspendieron en 10 ml de la solución de plasmolisis [Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM y sacarosa al 20% (p/v)], y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Con este tratamiento se liberan parte de las proteínas que se localizan en el periplasma de la bacteria. Posteriormente, las células se centrifugaron a 8.000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante constituía la fracción de sacarosa y el sedimento las células plasmolisadas. Estas se resuspendieron suavemente en 10 ml de agua a 4°C y se mantuvieron a esa temperatura durante otros 10 minutos (choque hipotónico). Con este tratamiento se liberan las proteínas periplásmicas que no lo han hecho previamente en la fracción de la sacarosa. Después de una centrifugación de 10 minutos a 4°C y 5.000 x g, se separó el sobrenadante (fracción H₂O) del sedimento (fracción celular). Este último se resuspendió en tampón TM y las células se rompieron mediante sonicación a 4°C (con dos tratamientos de 10 segundos cada uno). La fracción soluble (citoplasma) y la sedimentable (envolturas celulares) se separaron mediante ultracentrifugación a 100.000 x g durante 60 minutos.

6.2. Fraccionamiento subcelular mediante la formación de esferoplastos

Se siguió el procedimiento descrito por Koshland y Botstein (1980). Para ello, se cultivó la cepa *E. coli* HB101 [pCIP50] en 25 ml de medio LB con ampicilina hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm de 0,5 (fase exponencial media). Las células del cultivo se concentraron mediante centrifugación y se resuspendieron en 2,4 ml de una solución [Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 0,5 mM y sacarosa al 20% (p/v)] que contenía 0,24 mg de lisozima. Después de una incubación a 4°C durante 15-20 minutos, los esferoplastos formados (visualizados al microscopio) se estabilizaron añadiendo 45 µl de $MgCl_2$ 1M. La centrifugación a 8.000 x g durante 20 minutos a 4°C originó un sobrenadante que contenía proteínas periplásmicas (fracción periplásmica), y un sedimento celular que se sometió a choque hipotónico mediante resuspensión en 10 ml de agua a 4°C y agitación a esta temperatura durante 10 minutos. En este caso, y a diferencia de lo comenzado en el apartado 6.1., el choque hipotónico libera las proteínas citoplásmicas. La fracción soluble (citoplasma) se separó de la fracción sedimentable (envolturas celulares) mediante ultracentrifugación. La eficiencia en la formación de esferoplastos fue mayor del 95 %, como se pudo comprobar por observación directa al microscopio de contraste de fase, así como también por la reducida actividad enzimática detectada en el sedimento de una centrifugación a baja velocidad de los esferoplastos cuando éstos ya habían sufrido el choque hipotónico.

7. OBTENCION DE LAS PAREDES CELULARES DE NEUMOCOCO

7.1. Marcaje radiactivo de las paredes celulares

El marcaje de las paredes celulares de *S. pneumoniae* con cloruro de [metil- 3H]colina (60 Ci/mmol; Amersham) o con monohidrocloreto de L-[4,5- 3H]lisina (40 Ci/mmol, Amersham), se llevó a cabo añadiendo el isótopo correspondiente a la cepa R6 cultivada en medio CpH8 según se describe en Mosser y Tomasz (1970).

Para el marcaje de las paredes celulares que contienen etanolamina en lugar de colina, se añadió [2- ^{14}C]etanolamina (44 Ci/mmol, Amersham) o monohidrocloreto de L-[4,5- 3H]lisina (40 Ci/mmol) a la cepa R6 cultivada en medio Cden-EA según se describe en Hóltje y Tomasz (1975 b).

7.2. Aislamiento y purificación de las paredes celulares

Para llevar a cabo el aislamiento y purificación de las paredes celulares se siguió básicamente el método desarrollado por García-Bustos y Tomasz (1987). En resumen, se cultivó la cepa tipo R6 en medio CPH8, o en medio Cden-EA para la obtención de paredes que contienen etanolamina, en presencia del isótopo correspondiente hasta que el cultivo alcanzó una concentración celular de $3,7 \times 10^8$ UFC/ml. Las células se centrifugaron a $6.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C y el sedimento resultante se resuspendió en tampón fosfato-salino (tampón fosfato 20 mM, pH 6,9 más NaCl 0,15 M). Posteriormente, la suspensión celular se calentó a 90°C durante 30 minutos en presencia de SDS al 4% (p/v) con el fin de inactivar la autolisina de neumococo. Después de varios lavados con agua destilada para eliminar el SDS, la células se rompieron mediante "French-press" (American Instruments Company). El restante tratamiento hasta la obtención de las paredes celulares se realizó como se describe en García-Bustos y Tomasz (1987). Finalmente, las paredes celulares se resuspendieron de forma homogénea en tampón SPSH (tampón fosfato sódico 25 mM, pH8,0; β -mercaptoetanol 20 mM y NaCl 0,85%) a una concentración final de 1mg/ml (700 cpm/ μg para paredes marcadas con colina, 500 cpm/ μg para el marcaje con lisina).

8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA

8.1. Determinación de la actividad de las enzimas que hidrolizan la pared celular de neumococo

8.1.1. Ensayo enzimático de los extractos obtenidos de *E. coli*

Los extractos crudos de cepas de *E. coli* transformantes que expresan una actividad hidrolítica sobre la pared de neumococo se ensayaron siguiendo el procedimiento clásico para la determinación de la actividad amidásica en neumococo (Mosser y Tomasz, 1970), pero con algunas modificaciones.

En el caso de la amidasa LYTA, para proceder a su conversión el extracto celular se preincubó a 4°C durante 10 minutos en presencia de colina o análogos estructurales a una concentración final de 0,1 M o 0,5 M (Briese y Hakenbeck, 1985). Después de esta preincubación, la mezcla se diluyó con tampón TM hasta una concentración final inferior a 0,1 mM, con lo que se evita el efecto inhibitor del ligando sobre la actividad hidrolítica de pared al competir con los residuos de colina de las paredes celulares (apartado 2.3.1.2 de la Introducción). En el caso de las lisozimas CPL1 y CPL7 no es necesario el proceso previo de conversión.

La mezcla de reacción contiene 200 µl de tampón, a los que se añaden 10 µl de paredes celulares de neumococo marcadas radiactivamente (sustrato) y de 5 a 30 µl de la dilución adecuada del extracto celular convertido en su caso. La incubación se realiza a 37°C durante 10 minutos, y la reacción se detiene mediante la adición de 10 µl de formaldehído al 35% y 10 µl de seroalbúmina bovina al 4%. Las muestras se centrifugan en una microfuga Hettich a 10.000 x g durante 10 minutos. A 150 µl del sobrenadante de cada muestra se les añade 3,5 ml de líquido de centelleo (Cocktail-22 Normascint, Scharlau) y se determina la radiactividad en un contador de centelleo líquido LKB Wallac (modelo 1219 Racbeta). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la solubilización de 1 µg de pared en 10 minutos (Höltje y Tomasz, 1976).

8.1.2. Ensayo enzimático de las proteínas purificadas

La amidasa LYTA purificada en presencia de colina no requiere conversión para ensayar su actividad. Para ésta y el resto de las enzimas hidrolíticas de pared, la mezcla de reacción contiene 200 µl del tampón apropiado, 10 µl de paredes celulares de neumococo marcadas radiactivamente y 10 µl de la dilución adecuada de la enzima purificada. La incubación se realiza como se ha descrito en el apartado 8.1.1.

8.1.3. Caracterización del tipo de actividad lítica

Para determinar el tipo de actividad de las enzimas líticas se siguió el método descrito por García y cols. (1987). Se digirieron durante 16 horas 200 μ l de paredes de neumococo marcadas con colina o lisina con la cantidad apropiada de enzima más 300 μ l de tampón TM o fosfato según la enzima. La reacción se paró añadiendo 10 μ l de formaldehído al 35% y 10 μ l de seroalbúmina bovina al 4% y centrifugando la muestra en una microfuga Hettich durante 10 minutos a 10.000 x g. El sobrenadante se aplicó a una columna de Sephadex G-75 (1,5 x 50 cm) equilibrada en 0,15 M NaCl y se eluyó con la misma disolución. Se recogieron fracciones de 1,5 ml y se contó la radiactividad de 400 μ l de cada fracción como se describe en el apartado 8.1.1.

8.2 Ensayo de actividad de β -galactosidasa

El ensayo de actividad de β -galactosidasa se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Miller (1972) utilizando o-nitrofenil-galactósido (ONPG) como sustrato. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce un nmol de o-nitrofenol por minuto a 28°C.

9. PURIFICACION DE LAS ENZIMAS LITICAS DE PARED DE NEUMOCOCO Y DE SUS BACTERIOFAGOS.

9.1. Purificación mediante cromatografía de afinidad en Sepharosa-colina

Las enzimas de neumococo y de sus bacteriófagos que hidrolizan la pared celular de esta bacteria y cuya actividad depende de la presencia de residuos de colina en los ácidos teicoicos del sustrato, se purificaron en un solo paso mediante una cromatografía de afinidad utilizando columnas de Sepharosa-colina según se describe por Briese y Hackenbeck (1985).

Las enzimas se purificaron a partir de los extractos celulares obtenidos de las cepas transformantes de *E. coli* cultivadas hasta la fase estacionaria de crecimiento (16 horas) en el medio de cultivo adecuado para cada caso. Los extractos crudos se obtuvieron, después de

concentrar las células 30 veces en tampón fosfato, mediante la ruptura de las mismas en una "French-press" (American Instruments Company) a una presión de 7,6 atmósferas y posterior centrifugación a 4°C y 10.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante de esta centrifugación se aplicó a una columna de Sepharosa-colina preparada según Briesse y Hackenbeck (1985), equilibrada en tampón fosfato, y el restante proceso de purificación se realizó a 4°C. Después de lavar la columna con 3 volúmenes de tampón fosfato que contenía NaCl 1,5 M, la enzima retenida por interacción específica con la colina se eluyó con tampón fosfato que contenía NaCl 1,5 M y colina 140 mM. Las fracciones en las que se detectó actividad hidrolítica de pared se dializaron durante 12 horas frente a 300 volúmenes de tampón fosfato. La concentración de la proteína purificada se determinó mediante espectroscopía de absorción (apartado 10) , y su pureza se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (apartado 11). Las enzimas se conservaron a -20°C.

9.2. Purificación de la lisozima CPL1 por cromatografía de penetrabilidad

Para evitar la interacción de la lisozima CPL1 con colina se diseñó un procedimiento de purificación alternativo prescindiendo de las columnas de Sepharosa-colina. Los extractos crudos que contenían esta proteína, una vez centrifugados, se precipitaron fraccionadamente con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 4°C. El precipitado obtenido en el rango del 30-50% de saturación se disolvió en un volumen mínimo de tampón fosfato o TM y se procedió a una cromatografía de filtración en gel en una columna de Bio-Gel P-60 (100 x 6 cm), equilibrada y eluida con el mismo tampón de la muestra. Se recogieron las fracciones que presentaban la mayor actividad y pureza según el análisis en geles de poliacrilamida-SDS.

9.3. Purificación de la lisozima CPL7

La lisozima CPL7 no presenta afinidad por la colina, por lo que su purificación no se puede realizar en un solo paso mediante una cromatografía en Sepharosa-colina. Los extractos crudos de las cepas de *E. coli* que expresan estas proteínas se obtuvieron como se indica en el apartado 5 y se sometieron a una precipitación fraccionada con sulfato amónico a 4°C. La fracción sedimentable después de la precipitación con sulfato amónico al 50% de saturación se

resuspendió en 10 ml de tampón fosfato 20 mM pH 7,0 y se aplicó a una columna (100 x 6 cm) de cromatografía por filtración en gel (Bio-Gel P-60, Bio-Rad). La elución se realizó con el mismo tampón fosfato, y las fracciones en las que se detectó actividad hidrolítica de pared se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS reconociéndose las que mostraban mayor pureza.

9.4. Purificación desde geles de poliacrilamida

La purificación de proteínas por electroelución de geles de poliacrilamida-SDS se llevó a cabo como sigue: una vez realizada la electroforesis (apartado 11) se recortó la zona del gel en donde se encontraba la proteína y se introdujo en una bolsa de diálisis (Visking 20/32, Serva) con tampón TBE (Tris-borato 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH 8,0). La bolsa se introdujo en una cubeta de electroforesis horizontal con tampón TBE y se aplicó una tensión de 100 voltios durante 1 hora. Después se aplicó un pulso 30 segundos con la polaridad invertida para separar la proteína del celofán, con lo que la proteína se recogía finalmente en el tampón dentro de la bolsa.

10. VALORACION DE CONCENTRACIONES DE PROTEINA PURA

La concentración de las proteínas puras se valoró por espectroscopia de absorción. El conocimiento de la secuencia de la amidasa LYTA y las lisozimas CPL1 y CPL7 permite calcular su coeficiente de extinción molar en base a la composición de la proteína en aminoácidos aromáticos según los datos de ϵ_{280} a pH 7 publicados por Fasman (1976): $5.559 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para los residuos de triptófano, $1.197 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la tirosina y $0,7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la fenilalanina. Esto conduce a un ϵ_{280} de $87.483 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la amidasa LYTA, $113.322 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la lisozima CPL1 y $62.986 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la lisozima CPL7.

11. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS. La técnica empleada fue la descrita por Laemmli (1970) utilizando geles de poliacrilamida en placa (160 x 100 x 2 mm) entre el 7 y el 15%. Las muestras se hirvieron previamente durante 5 minutos en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; SDS al 2%; B-mercaptoetanol al 5%; glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,005%). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y corriente constante (50 mA), utilizando un tampón que contenía Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M y SDS al 0,1%. Las proteínas de los geles se visualizaron con azul brillante de Coomassie R-250 según se describe en Swank y Munkress (1971) o mediante la técnica de tinción con plata (Merril y cols., 1981) (Amersham). Las proteínas empleadas como marcadores de tamaño molecular se adquirieron de la casa comercial Bio-Rad.

12. DETERMINACION DE SECUENCIAS N-TERMINALES DE PROTEINAS

La secuencia de aminoácidos N-terminal de las distintas proteínas se determinó mediante el método de degradación de Edman según se describe en López y cols. (1982). Se utilizó un secuenciador automático modelo 477A (Applied Biosystems).

13. PREPARACION DE PLASMIDOS

La preparación de plásmidos a partir de cepas de *E. coli* se realizó utilizando el método de Birnboim y Doly (1979) tal y como lo describen Sambrook y cols. (1989).

14. MANIPULACION DEL DNA CON ENZIMAS DE USO COMUN EN BIOLOGIA MOLECULAR

Las endonucleasas de restricción se obtuvieron de Boehringer Mannheim, Amersham, Pharmacia y New England Biolabs. La fosfatasa alcalina de intestino de ternera se obtuvo de

Boehringer Mannheim. Amersham suministró la DNA ligasa y la polinucleótido quinasa del fago T4, así como el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Todas las enzimas y sus tampones correspondientes se utilizaron siguiendo las indicaciones recomendadas por las casas suministradoras.

15. ELECTROFORESIS DEL DNA EN GELES DE AGAROSA

Para realizar la electroforesis del DNA se utilizaron geles con 0,7% o 1% de agarosa (Bio-Rad) en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,1), empleando el mismo tampón como electrolito. A las muestras se les añadió 1/5-1/10 de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30% (p/v), azul de bromofenol al 0,2 % (p/v), xilencianol al 0,2% y EDTA 40 mM, pH 8,0. La electroforesis se realizó a 100-150 V durante 60-90 minutos, y una vez finalizada los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 µg/ml) para su visualización con radiación ultravioleta. Como marcador de tamaño se utilizó el DNA del fago lambda digerido con las enzimas de restricción HindIII o BstEII (Amersham).

16. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS FRAGMENTOS DE DNA

Los fragmentos resultantes de la digestión del DNA con las enzimas de restricción se aislaron y purificaron de 3 formas distintas.

16.1. Geles de poliacrilamida

Se utilizaron geles de poliacrilamida no desnaturalizantes a una concentración del 4% en tampón TBE. Se empleó como electrolito para la electroforesis el tampón TBE. A las muestras se les añadió 1/5-1/10 de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30% (p/v), azul de bromofenol al 0,2% (p/v), xilencianol al 0,2% y EDTA 40 mM, pH 8,0. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de metileno (0,04%) y se recortó la banda de DNA deseada en cada caso. El DNA se eluyó de la banda de acrilamida como se describe en Sambrook y cols. (1989).

16.2. Técnica del GeneClean

Los fragmentos que se desean aislar se separan mediante una electroforesis en geles de agarosa. Posteriormente, se recortan las bandas de interés y el DNA se purifica de la agarosa mediante su adsorción a diminutas partículas de vidrio siguiendo la técnica del GeneClean. El kit de GeneClean se utilizó como recomiendan los fabricantes (Bio 101 Inc., La Jolla, CA).

16.3. Geles de agarosa de bajo punto de fusión

Para algunos aislamientos de fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad) al 1-1,4% en tampón TAE. Una vez realizada la electroforesis, se cortó en cada caso la banda deseada del gel y se resuspendió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) con NaCl 0,25 M. La agarosa se fundió manteniéndola a 65 °C durante 5 minutos. A continuación, la muestra se trató con fenol y posteriormente con éter (v/v), incubándola después a 65 °C durante 10-15 minutos con el fin de eliminar los posibles restos de éste. El DNA se precipitó con dos volúmenes y medio de etanol absoluto durante 45 minutos a -70 °C. Tras una centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos, el precipitado se lavó con etanol al 70% y finalmente se disolvió en un volumen adecuado de tampón TE.

17. SECUENCIACION DEL DNA

La secuenciación del DNA se realizó según el método de Sanger y cols. (1977). Para la reacción de secuenciación se utilizó el Sequenase Kit (United States Biochemicals) y como nucleótido marcado radiactivamente, [α -³⁵S]dATP (Amersham), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. *E. coli* TGI fue la cepa utilizada como huésped para los bacteriófagos M13tg130 y M13tg131 (Kiery y cols., 1983).

18. MUTAGENESIS DIRIGIDA

Los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis dirigida, así como los empleados como cebadores para la secuenciación del DNA, se sintetizaron en un sintetizador de DNA LKB Gene

Assembler Plus (Pharmacia). Para llevar a cabo la mutagénesis dirigida se empleó el sistema de mutagénesis *in vitro* de Amersham (método de Sayers y cols., 1988), siguiendo el protocolo que detallan los fabricantes.

19. TECNICA DE "WESTERN-BLOT"

Las proteínas purificadas y las proteínas de los extractos crudos, una vez separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell) según se describe en Sambrook y cols. (1989). La membrana se saturó con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) en tampón PBS (fosfato sódico 10 mM, pH 7.4; NaCl 140 mM) mediante incubación a 4°C durante 12 horas. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 4 horas en presencia del suero correspondiente a cada proteína (García y cols., 1982). Después de 3 lavados con PBS que contenía Tween al 0,1% (v/v), de 10 minutos de duración cada uno, la membrana se hizo reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente y suave agitación con anticuerpos de cabra anti-IgGs de conejo conjugados con peroxidasa (Jackson Immunoresearch). Finalmente, tras un lavado con tampón PBS, las bandas de reacción con los anticuerpos se visualizaron con peróxido de hidrógeno y 4-cloro-1-naftol (Sigma)

20. MICROSCOPIA ELECTRONICA

Para la observación de células de *E. coli* al microscopio electrónico sin proceder a corte alguno, se centrifugó una alícuota del cultivo correspondiente y el precipitado se lavó dos veces con tampón acetato amónico 0,1 M, pH 7. Después, el precipitado celular se resuspendió en el mismo tampón y se observó directamente en un microscopio electrónico Phillips EM 300.

21. PREDICCION DE ESTRUCTURA SECUNDARIA

La predicción de estructura secundaria de la enzima CPLi se llevó a cabo por tres procedimientos distintos: El método de Chou y Fasman (1978) se siguió con las modificaciones de Gavilanes y cols. (1984). La predicción de estructura según Garnier y cols. (1978) se realizó

con el programa PROTEIN contenido en las utilidades DNASTar. Por último, se procedió a realizar la predicción según el método de Lim (1974). Con el objeto de obtener una posible estructura consenso se siguieron las siguientes reglas: a) los giros β predichos por Chou y Fasman tienen la mayor prioridad; b) la estructura de un residuo predicha por dos o más métodos se considera definitiva en la estructura consenso; c) cuando existe mayor discrepancia, las estructuras α -hélice y estructura β tienen mayor prioridad que la ordenación aperiódica; d) se descartan las estructuras en α -hélice y en estructura β que contengan menos de cinco o cuatro residuos respectivamente.

22 DICROISMO CIRCULAR

Los espectros de dicroísmo circular se registraron en un dicrógrafo Roussel-Jouan II. Para espectros en la región del ultravioleta cercano (320-240 nm) se utilizaron cubetas de un paso óptico de 1 cm, y el instrumento operó a una sensibilidad de 10^{-5} $\Delta A/mm$. Para espectros en el ultravioleta lejano (240-200 nm) las cubetas eran de 0.5-1 mm de paso óptico, y la sensibilidad se ajustó a 2×10^{-6} $\Delta A/mm$. La elipticidad media por residuo, $[\theta]$, se calculó con la relación $[\theta] = 3300 \times (A_L - A_R) \times c^{-1} \times d^{-1}$, donde $(A_L - A_R)$ es la diferencia de absorción dicroica, c es la concentración media de residuo (para espectros en la región del ultravioleta lejano) o de proteína (para el ultravioleta cercano), y d corresponde al paso óptico de la cubeta, expresado en cm.

Los cálculos de estructura secundaria a partir de los datos de dicroísmo circular se llevaron a cabo de acuerdo con los parámetros de Chang y cols. (1978) o Bolotina y cols. (1980) mediante el programa CDPROT desarrollado por Menéndez-Arias y cols. (1988). El peso medio utilizado por residuo fue de 116.

23. VALORACION DE CISTEINAS LIBRES Y BLOQUEO CON IAA

La valoración de grupos sulfidrilos libres se realizó siguiendo el método de Ellman (1959) usando ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) y midiendo la absorbancia a 412 nm del DTNB reducido ($\epsilon_{412} = 13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La reacción de valoración se llevó a cabo en tampón Tris 0,1 M pH 8,0 conteniendo EDTA 10 mM y SDS al 2% en su caso. La reacción de

bloqueo de los grupos SH libres se llevó a cabo en tampón Tris 66 mM, pH 8,0 , conteniendo SDS al 1,5 % y EDTA 7 mM durante 30 minutos en ausencia de luz.

24. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Los experimentos de espectroscopía de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540 a una temperatura constante de 25°C. Se utilizaron cubetas de 1 cm X 1 cm. Las concentraciones de proteína tenían una absorbancia menor de 0,05 para minimizar el efecto de filtro interno.

25. EXPERIMENTOS DE CALORIMETRIA

25.1. Calorimetría diferencial de barrido

Las medidas de calorimetría diferencial de barrido se llevaron a cabo en un calorímetro MicroCal MC-2 (MicroCal Inc., Northampton, MA), utilizando el programa DA-2 para la adquisición y análisis de datos. La concentración de lisozima CPL1 utilizada en los experimentos fue de 1 mg/ml, y la velocidad de calentamiento fue de 0,5 K/min mientras no se indique lo contrario. El tampón fue fosfato 20 mM, a pH 7,0 mientras no se indique lo contrario. La distorsión de la función de capacidad calorífica debida al tiempo de respuesta del aparato se corrigió mediante el método descrito por López-Mayorga y Freire (1987). Las variaciones en la capacidad calorífica de las muestras se registraron desde 25°C a 80°C a una presión de dos atmósferas. Las líneas de base se realizaron, en todos los casos, con el tampón de diálisis y en las mismas condiciones experimentales.

25.2. Calorimetría de reacción

Los estudios de calorimetría isoterma en flujo se realizaron en un microcalorímetro de flujo LKB 10700-1 a 25°C. La señal calorimétrica fue amplificada por medio de un microvoltímetro Keithley 150B y el calorímetro se calibró eléctrica y químicamente siguiendo el procedimiento descrito por Wadso (1968). Los experimentos de valoración se realizaron en

camión fosfato 20 mM pH 7.0 y la velocidad de flujo fue de 8 ml/hora. Los resultados experimentales fueron analizados mediante el uso de la ecuación

$$1/\Delta H = K_d/([L]\Delta H_{\max}) + 1/\Delta H_{\max}$$

donde [L] es la concentración de ligando, ΔH es la entalpía medida a esa concentración de ligando, ΔH_{\max} es la variación de entalpía medida a saturación de ligando y K_d es la constante de disociación. La ecuación mencionada está desarrollada en base a un único tipo de sitios de unión del ligando.

III RESULTADOS

I. NUEVO METODO DE PURIFICACION DE LAS ENZIMAS LITICAS DE NEUMOCOCO Y SUS BACTERIOFAGOS DEPENDIENTES DE COLINA

I.1. Estudio de la conversión de la amidasa LYTA con análogos de colina

Como se ha comentado en la Introducción (apartado 2.3.), tanto la lisozima CPLI como la autolisina mayoritaria de neumococo (amidasa LYTA) dependen de la presencia de colina en los ácidos teicoicos de la pared para llevar a cabo su actividad enzimática. Las regiones C-terminales de estas dos proteínas están presumiblemente implicadas en la interacción con los residuos de colina (García y cols., 1988) y son muy similares en cuanto a su secuencia de aminoácidos, por lo que es de suponer que las características de la interacción con colina sean muy parecidas en ambas enzimas. Sin embargo, el estudio de la interacción de análogos estructurales de la molécula de colina con la amidasa LYTA puede verse facilitado si, a tal fin, se utiliza el efecto de conversión (o activación) de la forma E de esta enzima por colina (apartado 2.3.1.1 de la Introducción), puesto que el grado de interacción de estos compuestos con la amidasa se puede relacionar con el mayor o menor grado de conversión de la enzima. De este modo, con un sencillo ensayo de actividad enzimática *in vitro* pueden estudiarse simultáneamente un gran número de compuestos. Como se ha expuesto más arriba, dada la similitud existente entre las regiones C-terminales de la amidasa y de la lisozima CPLI cabe suponer que los resultados obtenidos con la primera pueden constituir una buena aproximación al estudio del efecto de los mismos compuestos sobre la lisozima CPLI.

La molécula de colina consiste en un átomo de nitrógeno sustituido por tres grupos metilo y un grupo etanol, por lo que el átomo de nitrógeno posee una carga positiva permanente. Teniendo en cuenta estas características se eligieron para este estudio los análogos estructurales de colina que se muestran en la tabla 2. En ellos se ha variado el número y el volumen de los sustituyentes del nitrógeno y se ha mantenido, sustituido o suprimido el grupo OH de la molécula.

El ensayo de conversión se realizó como se describe en Materiales y Métodos con extractos de *E. coli* RB791 [pGL100] (García y cols., 1987). La conversión se llevó a cabo preincubando a

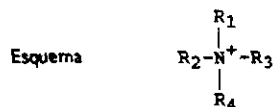
40°C los extractos con concentraciones de 0,1 ó 0,5 M del análogo correspondiente y diluyendo después la mezcla con objeto de que el análogo no pudiera inhibir la actividad enzimática de la amidasa convertida. Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 2. La característica más relevante es el hecho de que un gran número de análogos era capaz de convertir a la amidasa LYTA; entre ellos se encontraba la dietiletanolamina (DEAE) (compuesto I), componente del intercambiador aniónico DEAE-celulosa. Para comprobar si el DEAE pudiera tener un efecto inhibitorio sobre la actividad *in vivo* de la amidasa LYTA similar al provocado por altas concentraciones de colina en los medios de cultivo de *S. pneumoniae* (apartado 2.3.1.2) se incubó esta bacteria en presencia de 0,1 M de DEAE, observándose una inhibición de la separación de las células hijas y una consecuente formación de cadenas (figura 7) sin que se viera que afectara a la velocidad de multiplicación del cultivo. Además, en estas condiciones, no se observó lisis ni en la fase estacionaria de crecimiento ni inducida por detergentes. En definitiva, se reprodujeron las anomalías provocadas por un exceso de colina en los medios de cultivo de neumococo (Höltje y Tomasz, 1975a; Giudicelli y Tomasz, 1984a, b; Briese y Hackenbeck, 1985).

1.2. Purificación en un solo paso de las enzimas dependientes de colina mediante columnas de DEAE-celulosa

1.2.1. Purificación de la amidasa LYTA a homogeneidad electroforética

Puesto que la dietiletanolamina es capaz de interaccionar específicamente con la amidasa LYTA cabe la posibilidad de que la DEAE unida a la celulosa pudiera actuar como un ligando de adsorción específico de esta proteína. De este modo se podría conseguir la purificación de la enzima mediante cromatografía de afinidad en columnas de DEAE-celulosa, evitando así el uso de las columnas de Sepharosa-colina (Briese y Hackenbeck, 1985) cuyas desventajas más acusadas son su difícil regeneración y su alto coste. Para comprobar este punto, un extracto de 100 ml de un cultivo de *E. coli* RB791 [pGL100] inducido con lactosa (García y cols., 1987) se cargó en una columna de DEAE-celulosa previamente equilibrada en tampón Tris-maleato 50mM, pH 6,5 (volumen del lecho: 10 ml). La columna se lavó exhaustivamente con el mismo tampón incrementándose la fuerza iónica hasta una concentración de 1,5 M en NaCl.

TABLA 2. Análogos de colina como activadores de la amidasa LYTA de neumococo.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Conversión ^a	
					0,1M	0,5M
(A)	-CH ₂ CH ₂ OH	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	+	+
(B)	-CH ₂ CH ₂ OH	-CH ₃	-CH ₃	-H	+	+
(C)	-CH ₂ CH ₂ OH	-CH ₃	-H	-H	-	-
(D)	-CH ₂ CH ₂ OH	-H	-H	-H	-	-
(E)	-CH ₂ CH ₂ OH	-CH ₂ Ph ^b	-CH ₃	-CH ₃	+	+
(F)	-CH ₂ CH ₂ OCOPh	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	+	+
(G)	-CH ₂ CH ₂ SH	-CH ₃	-CH ₃	-H	+	+
(H)	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	-CH ₃	-CH ₃	-H	+	+
(I)	-CH ₂ CH ₂ OH	-CH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₃	-H	+	+
(J)	-CH ₂ CH ₂ OH	-CH ₂ CH ₂ OH	-CH ₂ CH ₂ OH	-H	-	+
(K)	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	+	+
(L)	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-H	-	+
(M)	-CH ₃	-CH ₃	-H	-H	-	-
(N)	-CH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₃	-H	+	+
(O)	-CH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₃	-H	-H	-	-
(P)	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	-H	-H	-H	-	-

^a Concentración del compuesto utilizada en el experimento de conversión.^b Ph: grupo fenilo.

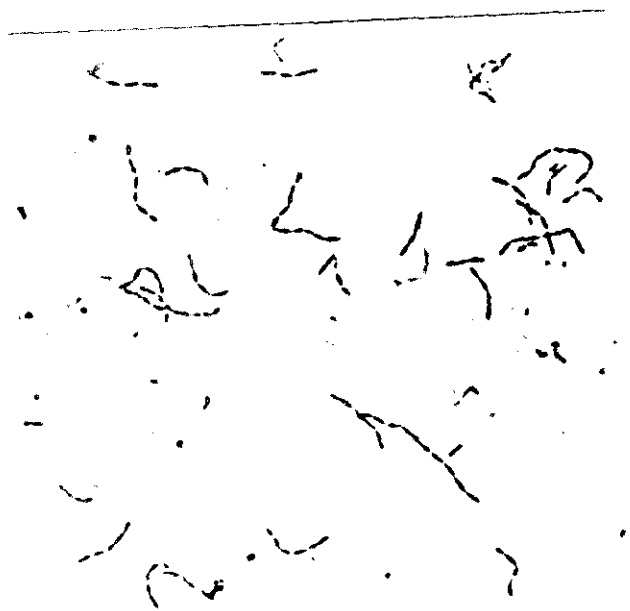


FIGURA 7. Efecto del DEAE sobre la morfología celular de neumococo. *S. pneumoniae* fue cultivado en medio Cph 8 que contenía DEAE al 2%. En la mitad de la fase logarítmica de crecimiento se retiró una muestra y se fotografió (x 940).

No se detectó en el eluido actividad lítica apreciable sobre paredes de neumococo, lo que indicaba que la enzima seguía retenida en la columna interaccionando específicamente con los residuos de DEAE. Se trataría entonces de un caso similar a la purificación por Sepharosa-colina, donde la proteína sólo puede eluirse tras la adición de colina libre al tampón de lavado. Cuando se pasó por la columna tampón Tris-maleato que contenía NaCl 1,5 M y colina al 2% se recuperó en el eluido toda la actividad lítica del extracto inicial. El análisis de las fracciones del eluido mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS mostró la presencia de una única banda cuyo peso molecular correspondía al de la amidasa LYTA (figura 8).

1.2.2. Purificación de otras mureín hidrolasas

Aprovechando la dependencia de colina que, de modo similar a la amidasa LYTA, presenta la lisozima CPLI para su actividad enzimática, se procedió a comprobar la validez del método de la DEAE-celulosa como soporte de afinidad en el proceso de purificación de esta proteína. Así, un extracto de un cultivo de *E. coli* HB101 [pCIP50] (García y cols., 1987) fue cargado en una columna de DEAE-celulosa en las mismas condiciones que en el apartado anterior, observándose de nuevo que virtualmente toda la actividad enzimática se retenía en la columna eluyéndose específicamente con colina. De igual modo el análisis en geles de poliacrilamida-SDS indicó la purificación de la lisozima CPLI a homogeneidad electroforética (figura 9).

Este nuevo método de purificación en un solo paso se empleó también con éxito en el caso de la amidasa HBL (Romero y cols., 1990a), la glucosaminidasa de neumococo y las enzimas líticas LYTA101, EJI, CLA, LCA y CL7 (Díaz, 1991).

1.2.3. Optimización de las condiciones de purificación

La interacción de las proteínas retenidas en la resina de DEAE-celulosa con los residuos de dietilanolamina no se ve afectada por el pH de la columna, puesto que cambios moderados en el mismo (5-11) no provocaron la elución de las proteínas.

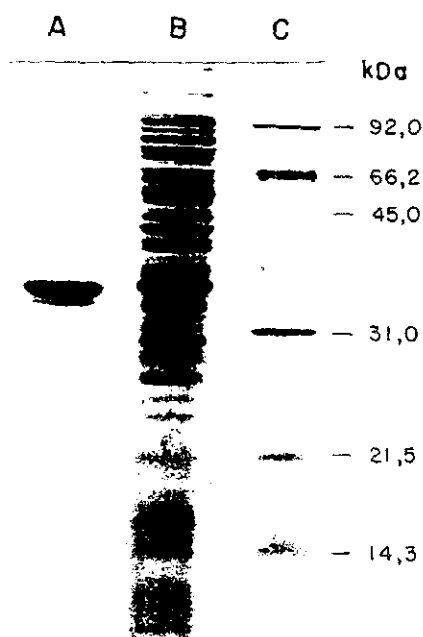


FIGURA 8. Purificación de la amidasa LYTA en DEAE-celulosa.

Calle A, amidasa LYTA purificada por DEAE-celulosa; calle B, extracto total obtenido de *E coli* RB791 [pGL100]; calle C, patrones de peso molecular. El gel de electroforesis de poliacrilamida-SDS era del 15%.

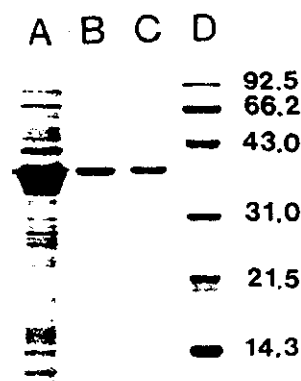


FIGURA 9. Purificación de la lisozima CPL I en DEAE-celulosa.

Calle A: Extracto de un cultivo de *E. coli* [pCIP100] inducido con lactosa 2%; Calle B: Lisozima CPL I purificada por cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa; Calle C: Lisozima CPL I purificada por cromatografía de penetrabilidad en Bio-Gel P-60; Calle D: Marcadores de peso molecular. Los pesos moleculares se indican en kilodalton. El gel de electroforesis de poliacrilamida-SDS era del 15%.

Sin embargo, cuando se elevó el pH a más de 12 se consiguió la recuperación de las proteínas, si bien desnaturalizadas. Este mismo resultado se obtuvo cuando la columna se lavó con una disolución de SDS al 2%. Por otro lado, compuestos análogos de colina que no son capaces de convertir la amidasa LYTA como la N-metiletanolamina resultaron ineficaces a la hora de eluir la proteína de la columna.

El tampón empleado en el procedimiento señalado en el apartado anterior era Tris-maleato. Sin embargo la utilización de este tampón presentaba ciertos problemas puesto que su pH variaba con la temperatura y presentaba un espectro de absorción en la región del ultravioleta, lo que provoca interferencias cuando se pretende estudiar una proteína mediante técnicas de espectroscopía de absorción o de dicroísmo circular. Por tanto se propuso utilizar tampón fosfato 20 mM, pH 7.0 en todas las disoluciones de equilibrado y lavado de la columna porque este tampón no presenta los problemas mencionados, observándose que la eficacia del proceso con el nuevo tampón no variaba apreciablemente.

La presencia de alta fuerza iónica en los tampones de lavado y elución (1,5 M de NaCl) no provocó efecto alguno sobre la actividad enzimática de las proteínas que se purificaron por este método. Sin embargo, con objeto de comprobar cómo funcionaría el procedimiento de purificación en el caso de una proteína cuya estabilidad fuera sensible a alta fuerza iónica, se procedió a purificar la lisozima CPL1 lavando la resina con el tampón fosfato conteniendo 0,5 M de NaCl, lo que supone una condición menos drástica que la anterior y por tanto un mayor tiempo de lavado, a la vez que un riesgo de menor purificación de la muestra. Una vez que la columna estaba lavada, se pasó tampón fosfato sin NaCl y más tarde la proteína se eluyó con tampón fosfato más 2% de colina en ausencia de NaCl. De nuevo, la proteína se purificó a homogeneidad electroforética, lo que demuestra que no es imprescindible la presencia de alta fuerza iónica para conseguir su elución de la columna, sino que tan sólo el ligando libre puede competir con los residuos de DEAE de la resina. Puesto que se observó que existen ciertas sustancias que absorben en la región del ultravioleta cuya elución de la columna a alta fuerza iónica es muy lenta, el procedimiento de lavado con tampón de baja fuerza iónica tras el paso de tampón de alta fuerza iónica (0,5 ó 1,5 M) presenta la ventaja añadida de impedir la elución de dichas sustancias con la proteína, las cuales quedarían retenidas en el soporte.

1.2.4. Uso de otros tipos de resina

Todos los datos que se han presentado hasta el momento se han obtenido utilizando la resina fibrosa de DEAE-celulosa, pero se ha podido comprobar que la DEAE-celulosa microgranular es igual de efectiva. Asimismo, tanto el dextrano (DEAE-Sephadex) como la acrilamida (DEAE-Biogel) dieron resultados similares en cuanto a la eficacia del procedimiento.

2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA LISOZIMA CODIFICADA POR EL BACTERIOFAGO Cp-1 (LISOZIMA CPL1)

2.1. Construcción de un vector que hiperexpresa la lisozima CPL1

Para realizar un estudio estructural exhaustivo de una enzima se requiere un sistema de alta producción de la proteína en cuestión. El plásmido pCIP50, utilizado hasta el momento para la obtención de lisozima CPL1, no era el idóneo para la producción de la suficiente cantidad de proteína porque el gen *cpl1* se expresa en este plásmido bajo el control de un promotor débil (García y cols., 1987) (figura 10), por lo que se propuso la clonación del gen *cpl1* en el vector pINIII-(lppP-5)-A3, del que se ha descrito su capacidad para la producción de grandes cantidades de proteína (Inouye e Inouye, 1985). Este vector contiene dos promotores muy fuertes en tándem, el de la lipoproteína y el del operón de la lactosa, seguidos de un sitio de unión al ribosoma y una secuencia de clonación múltiple (figura 10). Por otra parte, este vector expresa de forma constitutiva el gen *laci* que codifica para el represor del promotor *lac*.

La construcción de un plásmido que hiperexpresara el gen *cpl1* se llevó a cabo como se indica en la figura 10. El plásmido pCIP50 fue digerido parcialmente con la enzima *DraI* y posteriormente religado para formar el plásmido pDRA3. De este plásmido se obtuvo, tras una digestión con la enzima *Sau3AI*, un fragmento que contenía el gen *cpl1*, que fue insertado entonces en el sitio *BamHI* del vector pINIII-(lppP-5)-A3. La mezcla de ligación se usó para transformar células competentes de *E. coli* RB791. Los clones recombinantes se seleccionaron en base a su resistencia a ampicilina y a la actividad litica mostrada por extractos de cultivos de estos clones sobre paredes de neumococo. De uno de los clones que poseían mayor actividad se aisló el plásmido pCIP100 (figura 10). El sitio de clonación múltiple del vector está situado en el inicio del gen de la lipoproteína, por lo que la clonación de fragmentos en este lugar da origen a la formación de secuencias de fusión con dicho gen. Sin embargo la estrategia de clonación del gen *cpl1* en el sitio *BamHI* está diseñada de tal modo que si bien se crea un marco de lectura abierta originado por la fusión del fragmento *Sau3AI* con el gen de la lipoproteína, este marco se cierra antes del inicio del gen *cpl1*. De todos modos, con el objeto de comprobar que no se estaba expresando una proteína de fusión se determinó la secuencia amino-terminal de la lisozima CPL1

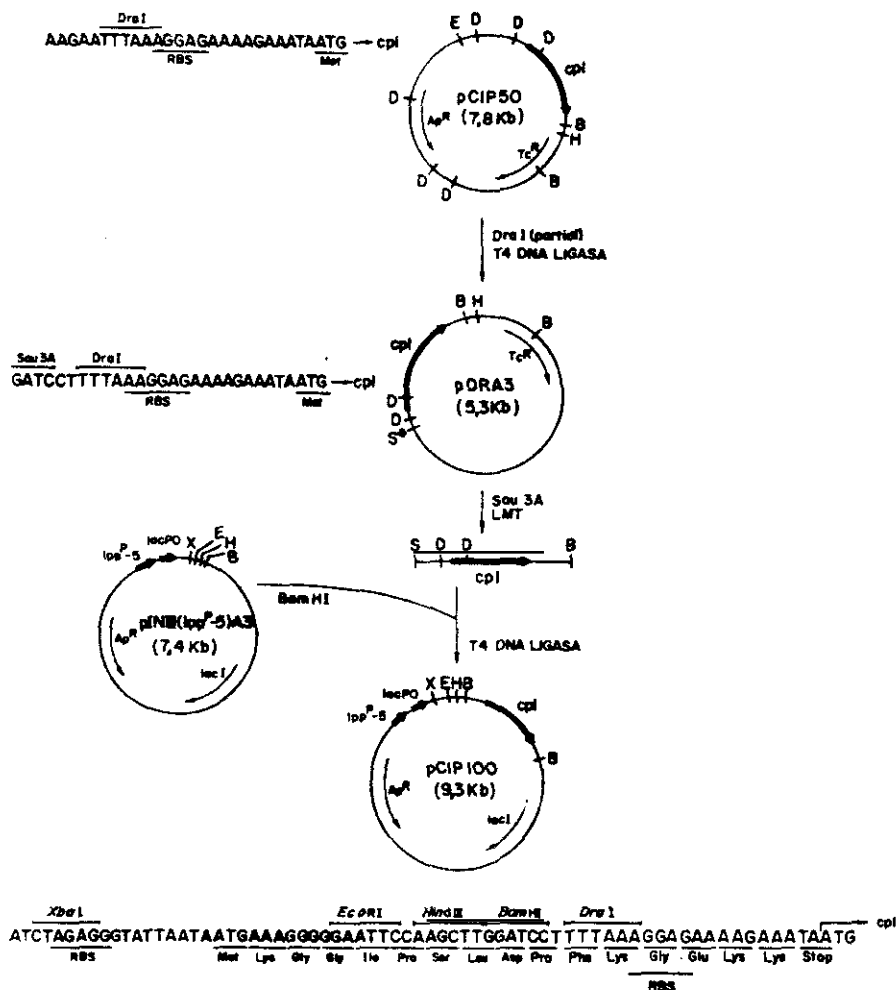


FIGURA 10. Construcción del plásmido pCIP100.

Sitios de restricción: B, *BamHI*; D, *DraI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; S, *Sau3A*; X, *XbaI*. El asterisco (*) significa que existen más sitios de restricción de esa clase de los que se indican. Se muestra la secuencia de fusión del fragmento *Sau3A*-*BamHI* del plásmido pORA3 con el plásmido pINIII-A3 y el marco de lectura abierto anterior al gen *cpl*. Otras abreviaturas: RBS, sitio de unión al ribosoma; LMT, aislamiento de DNA en geles de agarosa de bajo punto de fusión; *lppP*-5, promotor modificado de la lipoproteína; *lacPO*, promotor del operón de la lactosa.

purificada a partir de extractos de *E. coli* RB791 [pCIP100], obteniéndose la secuencia Val-Lys-Lys-Asn-Asp-Leu-Phe-Val que coincide con la predicha en base a la secuencia de nucleótidos del gen *cplI* con la excepción de la metionina inicial (García y cols., 1988).

2.2. Condiciones óptimas de producción de la lisozima CPLI

Como ya se ha dicho en el apartado anterior, la expresión del gen de la lisozima CPLI está regulada en el plásmido pCIP100 por el promotor del operón de la lactosa. Dado que el gen *laci* se expresa en este plásmido de forma constitutiva, se necesita la presencia de un inductor como la lactosa en el medio de cultivo para conseguir la producción de altas cantidades de lisozima. Las condiciones óptimas de producción de la lisozima CPLI se obtuvieron incubando *E. coli* RB791 [pCIP100] en medio LB suplementado con 2% de lactosa durante 16 horas con agitación a 37°C. En la figura 9 se muestra un análisis en gel de poliacrilamida-SDS de un extracto de un cultivo inducido con lactosa incubado como se ha indicado, pudiendo observarse la gran producción de proteína. Con este procedimiento se consiguieron rendimientos en torno a 35 mg de lisozima CPLI pura por litro de cultivo. Sin embargo, ciertos problemas de estabilidad con la cepa RB791 nos indujo a transformar la cepa DH1 con el plásmido pCIP100. El nuevo clon, capaz asimismo de asimilar lactosa, permitió la obtención de cantidades de proteína similares a las obtenidas en la cepa RB791 pero demostró ser más estable en cuanto a la producción de proteína.

2.3. Algunos datos bioquímicos de la lisozima CPLI

En la figura 11 se muestra el efecto del pH, la fuerza iónica y la presencia de colina sobre la actividad lítica de la lisozima CPLI sobre paredes aisladas de neumococo. Pudo comprobarse que el pH de máxima actividad para la enzima estaba situado en 5,0, en desacuerdo con el pH de 6,0 previamente publicado (García y cols., 1987) debido probablemente a que el empleo de tampón fosfato en este último trabajo a pH 5,0 no es correcto. Por su parte, una concentración de NaCl de 250 mM en el ensayo provocaba una inhibición del 50% en la actividad enzimática, y ésta resultaba completamente inhibida a 500 mM. Por último pudo comprobarse cómo la colina libre era capaz de inhibir completamente la actividad en concentraciones de 10 mM o superiores. Como se ha descrito previamente (García y cols., 1987), esta inhibición es de carácter no

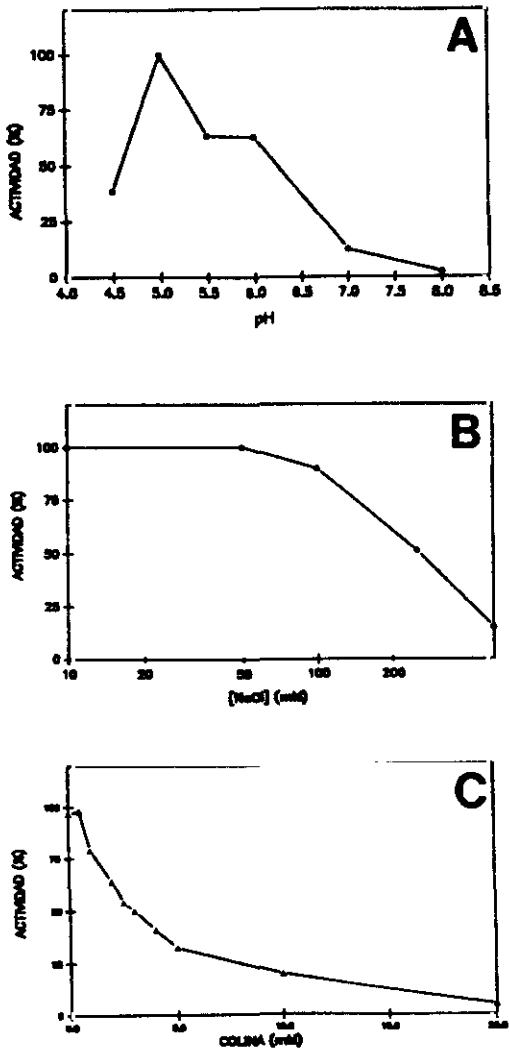


FIGURA 11. Características bioquímicas de la isozima CPL I.

Variación de la actividad enzimática con: A) pH; B) fuerza iónica; C) colina. Los datos de actividad se dan en porcentaje con respecto al máximo.

competitivo y puede ser debida a que el ligando interfiere en la interacción de la lisozima CPLI con los residuos de colina de los ácidos teicoicos de la pared de neumococo.

2.4. Análisis estructural de la lisozima CPLI

2.4.1. Estudios de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular de la lisozima CPLI se muestran en la figura 12. El espectro registrado en la región del ultravioleta lejano (240-200 nm) a pH 7,0 (figura 12A) muestra un mínimo a 230 nm y otro a 210 nm, con un hombro a 217 nm. Utilizando el programa CDPROT desarrollado por Menéndez Arias y cols. (1988) se dedujo que la estructura secundaria de la proteína estaría compuesta de un 19% en α -hélice, 32% de lámina B, 28% de giros B y 21% de ordenación aperiódica según los parámetros de Chang y cols. (1978) suponiendo una media de 10 residuos por hélice. De acuerdo con los parámetros de Bolotina y cols. (1980) se obtuvo una composición similar con un 19% de α -hélice, 35% de lámina B, 32% de giros B y 14% de ordenación aperiódica. Los ajustes no son todo lo buenos que cabría esperar (figura 13) debido fundamentalmente a la forma inusual del espectro en la región de 220-235 nm, la cual podría explicarse por la contribución de aminoácidos aromáticos en esta zona del espectro (Brahms y Brahms, 1980). Por otro lado, el espectro registrado en la región del ultravioleta cercano (320-240 nm) (figura 12B) muestra una banda de elipticidad positiva a 260 nm y otra de elipticidad negativa centrada a 295 nm.

2.4.1.1. Efecto de diversos agentes sobre los espectros de dicroísmo circular

El espectro de la lisozima CPLI muestra cambios mínimos cuando se incrementa la fuerza iónica hasta 1 M en NaCl a pH 7,0 (figura 12). La adición de sal cambia las bandas de 210 y 217 nm por una centrada a 209 nm. Por lo tanto, la inhibición de la actividad enzimática que se observa a alta fuerza iónica (figura 11) debe explicarse en base a la interacción de los iones con residuos cargados que son importantes para la catálisis más que en función de posibles cambios en la estructura secundaria. Por otro lado, cuando se varió el pH se observaron mínimos cambios en los espectros en la región del ultravioleta lejano en el rango comprendido entre 6 y 10 (figura

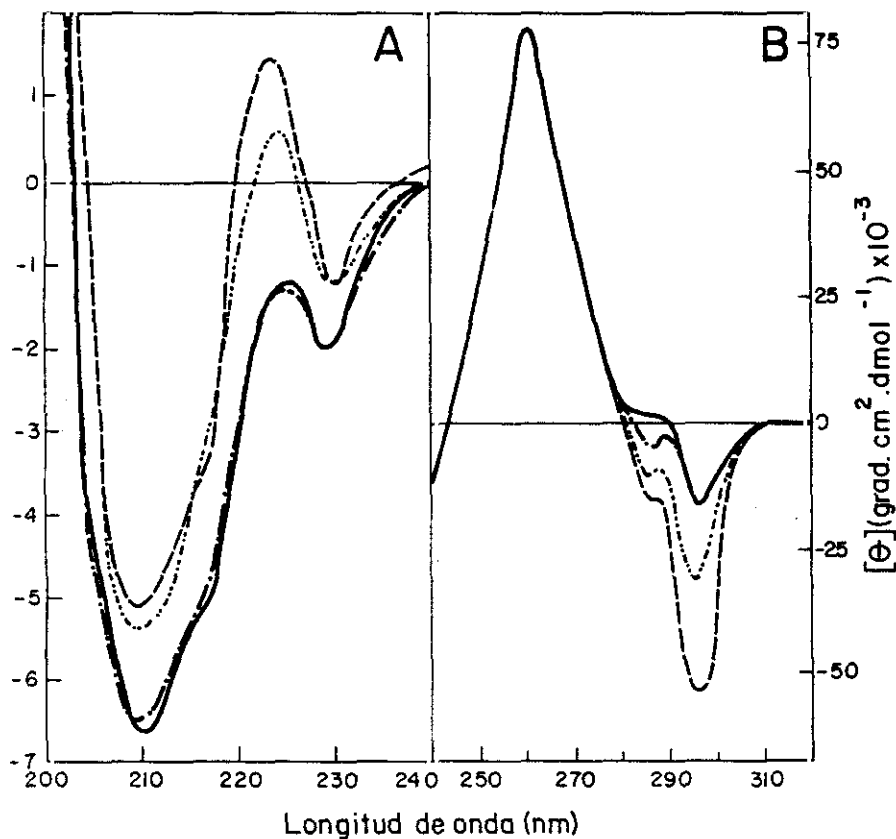


FIGURA 12. Espectros de diroísmo circular de la lisozima CPL1.

Panel A: Región del ultravioleta lejano (0,125 mg/ml); **Panel B:** Región del ultravioleta próximo (1,5 mg/ml). (—), Espectro registrado en tampón fosfato 20 mM pH 7,0; (---), en tampón fosfato más 1 M NaCl; (-·-·-), en tampón fosfato más 10 mM colina; (- - - -), en tampón fosfato más 10 mM colina más 0,5 M NaCl.

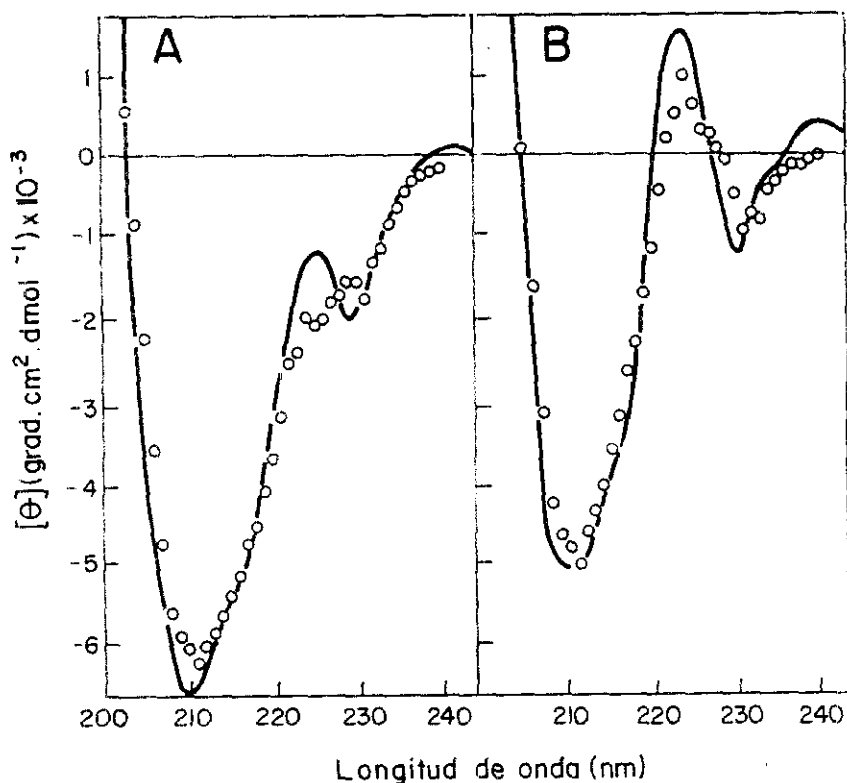


FIGURA 13. Cálculo de la estructura secundaria de la lisozima CPL por el programa CDPROT.

Panel A: Espectro registrado a una concentración de 0.125 mg/ml en tampón fosfato 20 mM pH 7.0; **Panel B:** en tampón fosfato conteniendo 10 mM colina. Los círculos indican las elipticidades calculadas a cada longitud de onda por el programa de ajuste según los parámetros de Bolotina y cols. (1980).

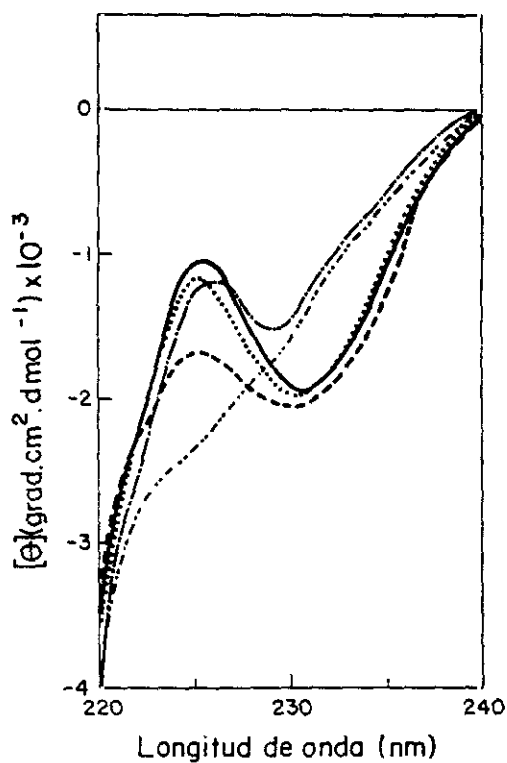


FIGURA 14. Efecto del pH en el espectro de dicroísmo circular de la lisozima CPLI en el ultravioleta lejano.
(-----), pH 5.6; (—), pH 7.0; (.....), pH 8.0; (-.-.-.-), pH 10.9; (-.-.-.-.-), pH 12.0.

14). A pH 12 se observó un incremento de la contribución de estructura aperiódica hasta alcanzar un 50%, lo que podría indicar una desnaturalización parcial de la proteína. Este hecho estaría de acuerdo con una drástica disminución de las intensidades de las bandas de 260 y 295 nm en los espectros en el ultravioleta próximo a este pH que indican una pérdida de estructura terciaria. A pH menor de 5.5, la proteína precipitó a las concentraciones empleadas y no se pudieron obtener datos en estas condiciones.

2.4.2. Predicción de la estructura secundaria de la lisozima CPL1

La predicción de estructura secundaria de la lisozima CPL1 se muestra en la figura 15. Se eligieron para este fin los tres métodos más utilizados en la literatura como son el de Chou y Fasman (1978), Lim (1974) y Garnier y cols. (1978). Aunque la combinación de métodos de predicción no mejora necesariamente el grado de ceridumbre de ésta (Nishikawa y Ooi, 1986), se obtuvo una estructura secundaria consenso a partir de los tres métodos citados en favor de una mayor simplicidad en la presentación de los resultados, usándose para ello una serie de reglas sencillas y lógicas como se describe en el apartado 21 de Materiales y Métodos. La estructura final, producto de la combinación señalada, tiene una composición de un 15% de α -hélice, 31% de lámina β , un 32% de giros β y un 22% de estructura aperiódica, lo que se ajustaría al resultado del análisis de los espectros de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano (apartado 2.4.1).

En cuanto al análisis de la estructura consenso, puede observarse que la región C-terminal de la proteína tiene un alto porcentaje de probables giros β y ordenación aperiódica, mientras que la región N-terminal tendría un mayor contenido en conformación de α -hélice y estructura β . Un punto que hay que considerar es el hecho de que las seis subsecuencias repetidas P1 a P6 que componen la región C-terminal de la proteína (García y cols., 1988) no mostrarían el mismo patrón repetido de estructura secundaria, sino que la estructura global de esta zona consistiría en la presencia de dos módulos lámina-giro-hélice conectados por cinco estructuras giro-lámina.

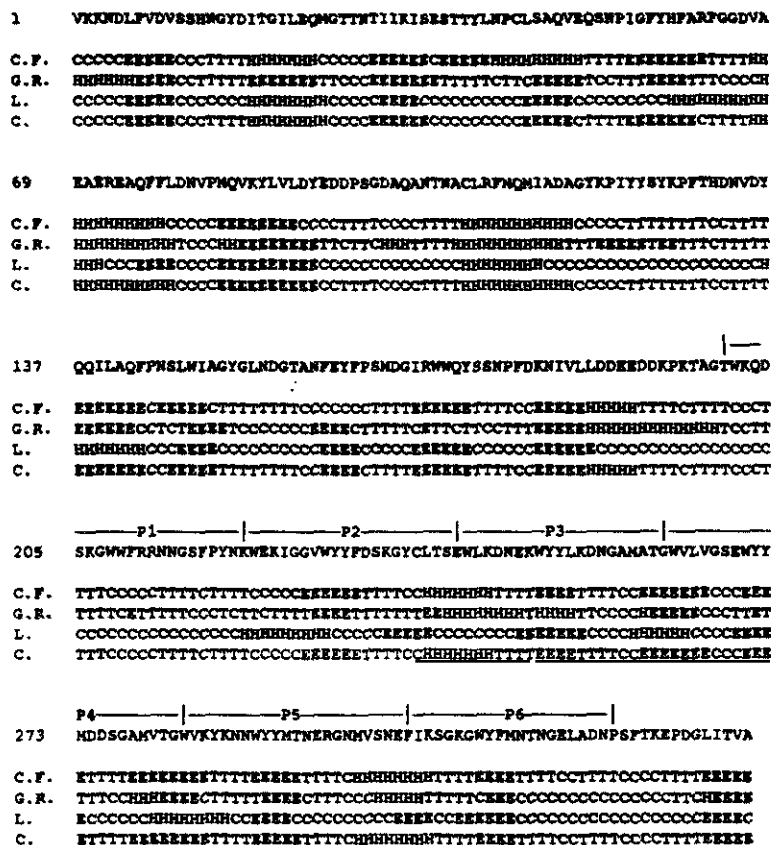


FIGURA 15. Predicción de la estructura secundaria de la lisozima CPL1. C.F., predicción de acuerdo con el método de Chou y Fasman (1978); G.R., predicción de acuerdo con el método de Garnier y cols. (1978); L., predicción según el método de Lim (1974); C., estructura consenso. Los diferentes tipos de estructura secundaria se abrevian como sigue: H, α -hélice; E, conformación β o extendida; T, giros β ; C, ordenación aperiódica.

2.4.3. Experimentos de apagamiento de fluorescencia

El espectro de fluorescencia de la lisozima CPL1 con excitación a 295 nm se muestra en la figura 16. Puede observarse un máximo situado a 335 nm, lo que indica un desplazamiento al azul con respecto a los espectros del triptófano en disoluciones acuosas. Esto se explicaría suponiendo que los residuos de triptófano se encontraran resguardados en cierto grado del disolvente. Con objeto de estudiar el entorno de los aminoácidos aromáticos de la proteína, y más concretamente de los residuos de triptófano, se procedió a registrar los espectros de fluorescencia obtenidos por excitación a 295 nm en presencia de agentes extintores de fluorescencia. Tres de estos agentes, el ión I^- (cargado negativamente), el ión Cs^+ (positivo) y la acrilamida (neutro) fueron elegidos para llevar a cabo estos estudios. Se midió la disminución de fluorescencia a 334 nm y se construyeron los diagramas correspondientes de Stern-Volmer (figura 17).

El diagrama correspondiente a la acción de la acrilamida se representa en la figura 17A. El proceso de extinción se ajusta bien a la ley de Stern-Volmer, obteniéndose una constante de extinción colisional $K_{SV} = 12 \text{ M}^{-1}$ (tabla 3) que no resulta afectada por la adición de colina 20 mM ($K_{SV} = 11,5 \text{ M}^{-1}$). El ajuste no resulta tan bueno en el análisis de extinción por ión yoduro (figura 17B) puesto que la gráfica aparece algo curvada hacia abajo. Ajustando la parte inicial de la gráfica según la ley de Stern-Volmer, se obtendría una constante K_{SV} de $1,0 \text{ M}^{-1}$ que indica una baja eficiencia en el proceso de extinción tal vez explicable por la posible presencia de cargas negativas cercanas a los fluoróforos o por la diferente accesibilidad de éstos al agente extintor (Lehrer, 1971; Eftink y Ghiron, 1981). Los experimentos de extinción por ión cesio (figura 17C) muestran una gráfica mucho más curvada, indicando tal vez un proceso de extinción preferencial debido a la acumulación de Cs^+ cerca de los residuos de triptófano, aunque la baja eficiencia de este ión como agente extintor unido a la posible diferencia de accesibilidad de los triptófanos en este caso pueden complicar la explicación de la curva (Eftink y Ghiron, 1981).

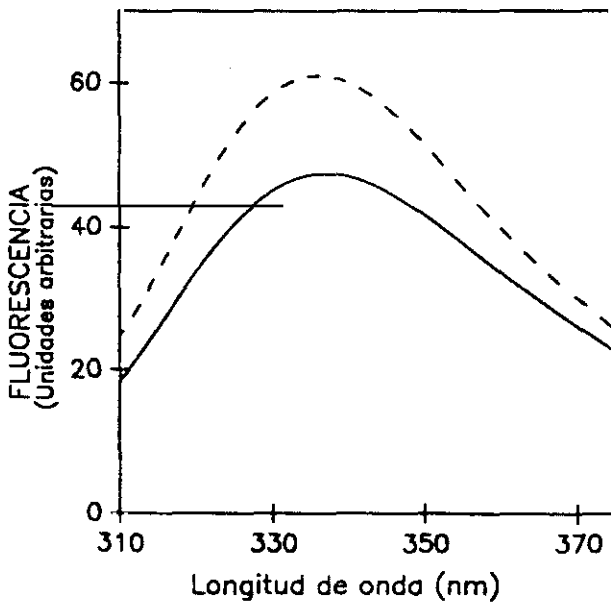


FIGURA 16. Espectro de fluorescência intrínseca de la lisozima CPL1.

Una disolución de 20 $\mu\text{g/ml}$ de lisozima CPL1 en tampón fosfato 20 mM pH 7,0 se sometió a excitación por radiación a una longitud de onda de 295 nm. (—), en ausencia de colina; (----), en presencia de colina 20 mM.

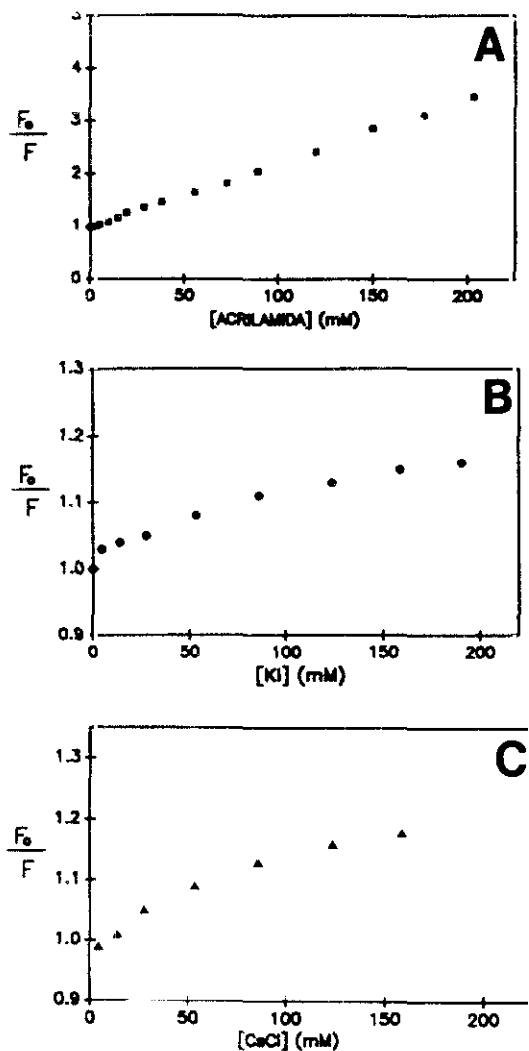


FIGURA 17. Diagramas de Stern-Volmer de apagamiento de fluorescencia de la lisozima CPL1. Extinción de fluorescencia a 334 nm por: A, acrilamida; B, ión yoduro; C, ión cesio. F_0 , fluorescencia en ausencia de agente extintor; F , fluorescencia en presencia del agente extintor.

**TABLA 3. Constantes de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la lisozima
CPLI**

Agente extintor	$K_{SV} \text{ (M}^{-1}\text{)}^a$
Acritamida	12,0
Yoduro (I^-)	1,0 ^b
Cesio (Cs^+)	2,1 ^b

^a Constante de quenching dinámico de la ecuación de Stern-Volmer $F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$ donde $[Q]$ es la concentración de agente extintor.

^b Calculada a partir de la parte inicial de la curva.

2.4.4. Valoración de cisteínas libres en la lisozima CPLI

La lisozima CPLI posee tres cisteínas en su secuencia de aminoácidos (García y cols., 1988). Para averiguar si dos de ellas se encontraban formando un puente disulfuro se procedió a la valoración de grupos SH libres siguiendo el procedimiento de Ellman (1959) utilizando DTNB y midiendo la absorbancia a 412 nm producida por el DTNB reducido. Pudo observarse que mientras la proteína no estaba desnaturalizada se obtenía un resultado de 1,7 cisteínas libres por molécula de proteína, lo que era incongruente pues se esperaba obtener un valor correspondiente a 1 ó 3. Sin embargo, la adición de SDS en el ensayo provoca el desplegamiento de la proteína y un aumento en la absorbancia a 412 nm hasta un valor final que indica la presencia de 3,0 grupos SH libres por molécula de proteína.

2.5. Localización subcelular de la lisozima CPLI en *Escherichia coli*

Cuando la amidasa LYTA de *S. pneumoniae* se sintetiza en *E. coli*, la mayoría se localiza en la periferia celular, bien en forma soluble (15%) o asociada mediante interacciones débiles a la cara periplásmica de la membrana interna de la célula (65%) (Díaz y cols., 1989). Para estudiar la localización de la lisozima CPLI en el mismo sistema se procedió al fraccionamiento subcelular por choque osmótico (Nossal y Heppel, 1966) y por formación de esferoplastos (Beacham, 1979) de las células de *E. coli* HB101 [pCIP50] (García y cols., 1987), como se describe en el apartado 6 de Materiales y Métodos. Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 4. El fraccionamiento por choque osmótico muestra que aproximadamente un 60% de la lisozima CPLI se encuentra en la fracción periplásmica (fracción de sacarosa más la fracción de H₂O) aunque el marcador periplásmico (β -lactamasa) se encuentra en esta fracción en un 90%. Sin embargo, la formación de esferoplastos sólo permitió la liberación de la lisozima CPLI en la fracción periplásmica de un 10%. Siguiendo el mismo razonamiento que en el caso de la localización de la amidasa LYTA (Díaz y cols., 1989) podría concluirse que, aunque la lisozima CPLI estuviera mayoritariamente asociada a la envoltura celular de *E. coli* HB101 (60%), sólo un 10% se localizaría en el periplasma, encontrándose el resto asociado a la membrana por interacciones débiles. Por último habría que resaltar el hecho de que una cierta fracción de la lisozima CPLI se encuentra en el medio extracelular.

TABLA 4. Localización subcelular de la lisozima CPLI expresada en *E. coli*.

A. Fraccionamiento por choque osmótico.

Enzima	Fracción			
	Medio extracelular ^a	Sacarosa	H ₂ O	Citoplasma
CPLI	6	3	54	37
ICDH	2	4	6	88
β -lactamasa	N.D. ^b	52	39	9

B. Fraccionamiento por formación de esferoplastos.

Enzima	Fracción		
	Medio extracelular ^a	Periplasma	Citoplasma
CPLI	13	9	78
ICDH	N.D.	22	78
β -lactamasa	N.D.	100	N.D.

^a Porcentaje de actividad enzimática con respecto a la actividad total.^b N.D. No detectado.

3. CARACTERIZACION DE LA INTERACCION DE LA LISOZIMA CPLI CON COLINA

3.1. Termodinámica de la unión de colina a la lisozima CPLI

La unión de la colina a la lisozima CPLI fue estudiada por calorimetría de reacción a 25°C según el procedimiento descrito en el apartado 2.5 de Materiales y Métodos. En la figura 18 se ha representado la curva de valoración de la proteína por el ligando. La baja afinidad de la colina hacia la enzima no permite determinar el número de sitios de unión por mol de lisozima CPLI a partir del valor mínimo de la relación ligando/proteína para la que el efecto térmico observado es máximo. El ajuste de los datos experimentales al comportamiento descrito (apartado 2.5.2. de Materiales y Métodos) demuestra, con todo, la existencia de una sola clase de sitios de unión, obteniéndose un valor de $-160,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ para ΔH_{max} , y una constante de disociación, K_d , de 2,4 mM. Los valores de la energía libre de Gibbs y de entropía calculados a partir de estos datos fueron $-14,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ y $-488 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ respectivamente.

3.2. Cambios conformacionales de la lisozima CPLI inducidos por colina

3.2.1. Estudios de dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular de la lisozima CPLI correspondiente a la región del ultravioleta lejano (240-200 nm) muestra, como se describe en el apartado 2.4.1., dos mínimos a 210 y 230 nm y un hombro a 217 nm, características que a pH neutro no resultan influidas por la presencia de NaCl 1 M (figura 12). Sin embargo, la presencia de colina (10 mM) provoca un cambio conformacional en la enzima que se manifiesta en una disminución de la intensidad de las bandas de 210 y 230 nm y la aparición de una banda con elipticidad positiva alrededor de 225 nm (figura 12A). Este cambio resultó ser completamente reversible puesto que tras eliminar la colina por diálisis se reprodujo exactamente el espectro inicial de dicroísmo circular.

Para comprobar si la lisozima CPLI purificada por el procedimiento de la DEAE-celulosa (apartado 1) perdía toda la colina unida tras la diálisis de la proteína eluida de la columna, se

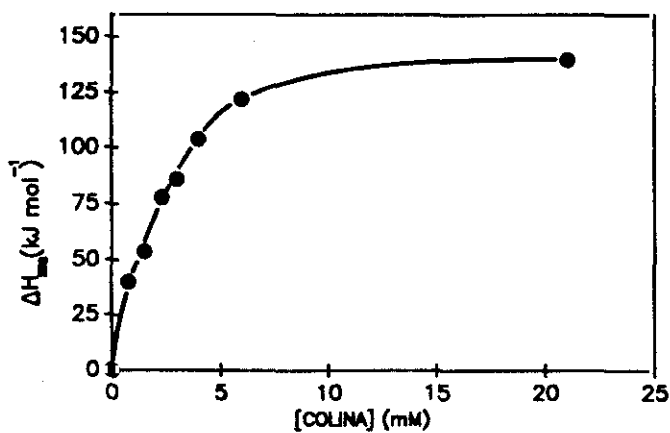


FIGURA 18. Entalpía de la unión de colina a la lisozima CPL1.

Los experimentos de calorimetría de reacción se llevaron a cabo con distintas concentraciones de colina a 25°C.

realizó una purificación alternativa de la enzima mediante la cual la colina no estaba presente en ninguna etapa (figura 9) (apartado 9.2 de Materiales y Métodos), obteniéndose el mismo espectro que el que resulta de la proteína purificada por el método convencional de afinidad tras el proceso de diálisis.

Cuando se ajusta el espectro de dicroísmo circular de la proteína en presencia de colina a los parámetros de Chang y cols. (1978), se obtiene una composición de 19% en α -hélice, 19% de conformación β , 43% de giros β y 19% de ordenación aperiódica. Sin embargo la aparición de una banda inusual a 225 nm podría también ser debida a una contribución de la absorción de aminoácidos aromáticos en esta región como describen Brahms y Brahms (1980). El espectro de dicroísmo circular de la lisozima CPLI en el ultravioleta cercano muestra una banda a 260 y otra a 295 nm (figura 12B) que se atribuyen a la disposición de los aminoácidos aromáticos en la estructura terciaria de la proteína. La interacción con colina provoca un aumento de la intensidad de la banda de 295 nm, que sólo puede explicarse por la contribución de triptófanos o de residuos ionizados de tirosina (figura 12B). El cambio de intensidad de las bandas de 225 y 295 nm tras la adición de colina mostró una correlación entre las variaciones de las dos bandas (figura 12), lo que apoyaba la hipótesis de la contribución de residuos aromáticos en la zona de 225 nm. La adición de NaCl 0,5 M redujo la intensidad de las bandas, lo que sugiere que existe una componente electrostática en la interacción de la colina con la lisozima CPLI que podría estar apantallada en presencia de alta fuerza iónica. Por otro lado, dos análogos de colina que son capaces de provocar la conversión de la amidasa LYTA, la benzilcolina y la *N*-bencil-*N,N*-dimetiletanolamina (apartado 2.3.1.1), pueden inducir en los espectros de dicroísmo circular de la enzima CPLI cambios similares a los producidos por colina. Sin embargo, no se observó ningún cambio apreciable con etanolamina, compuesto incapaz de convertir a la enzima LYTA.

Con objeto de comprobar si los cambios en los espectros de dicroísmo circular inducidos por colina podrían correlacionarse con alguna variación de las propiedades enzimáticas de la lisozima CPLI, se realizó una titulación con colina tanto de la actividad enzimática como de la intensidad de la banda centrada en 295 nm.

Como se observa en la figura 19, la actividad enzimática se inhibe conforme aumenta la concentración de colina en la misma medida que se incrementa la intensidad de la banda de 295 nm. El 50% de inhibición enzimática y el 50% de cambio de elipticidad ocurren a la misma concentración de colina, en torno a 2-3 mM, lo que sugiere que ambos acontecimientos están relacionados.

3.2.2. Experimentos de fluorescencia

El espectro de emisión de fluorescencia de la lisozima CPLI obtenido por excitación a 295 nm se muestra en la figura 16. Esta longitud de onda es la indicada para excitar los residuos de triptófano y las posibles tirosinas ionizadas de la proteína. Como se había indicado anteriormente (apartado 1.5.3), el espectro muestra un máximo a 335 nm. La adición de colina provoca un ligero desplazamiento del máximo a 334 nm y un aumento apreciable de la intensidad de la emisión (figura 16). Esto supone que, antes de la adición de la colina, la fluorescencia de los residuos aromáticos podría hallarse parcialmente extinguida con la consiguiente disminución en el rendimiento cuántico de estos residuos. La unión de colina provocaría entonces un cambio conformacional que liberaría a los aminoácidos aromáticos del agente extintor de fluorescencia. El 50% del cambio de fluorescencia a 334 nm se produce con concentraciones de colina en torno a 2-3 mM (figura 20). Aunque la colina podría unirse a zonas de contenido hidrofóbico, como se ha apuntado más arriba (apartado 3.2.1), este ligando no es capaz en una concentración de 20 mM de proteger a los aminoácidos aromáticos de la extinción de fluorescencia por acrilamida (apartado 2.4.3.).

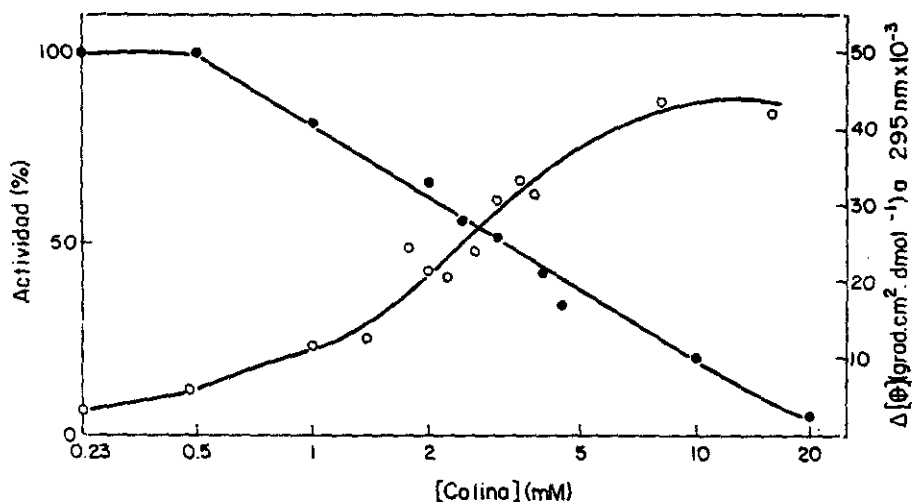


FIGURA 19. Efecto de la colina sobre la actividad enzimática y el espectro de dicroísmo circular de la lisozima CPLI.

(●—●), porcentaje de actividad enzimática con respecto a 0 mM colina. (○—○), incremento de la elipticidad medida a 295 nm con respecto a una muestra en 0 mM colina.

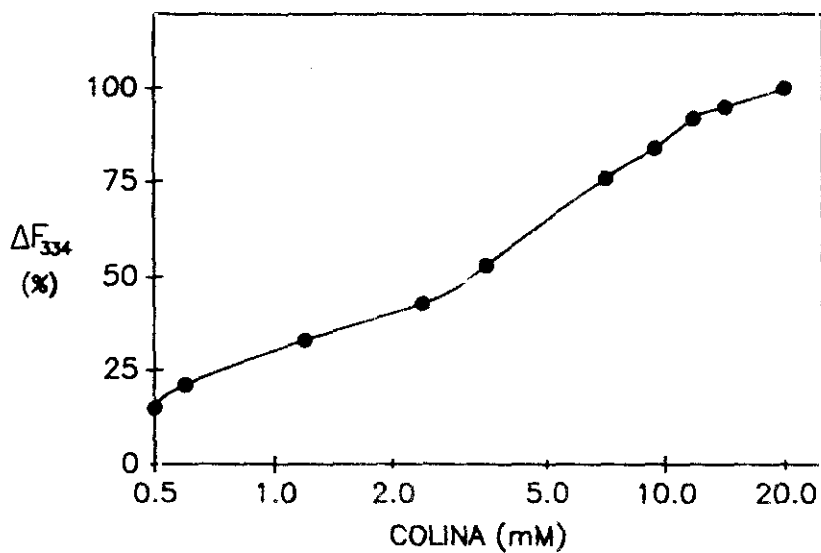


FIGURA 20. Variación de la intensidad de fluorescencia a 334 nm de la lisozima CPLI con la concentración de colina con respecto a una muestra en ausencia de colina.

4. LA ESTRUCTURA MODULAR DE LAS LISOZIMAS DE LOS BACTERIOFAGOS Cp-1 Y Cp-7

4.1. Estudios sobre el dominio C-terminal de la lisozima CPL1 obtenido por ingeniería genética (C-CPL1)

4.1.1. Clonación y expresión de la región 3' del gen *cpl1*

El proceso de clonación de la región 3' del gen *cpl1* se muestra en la figura 21. La digestión del plásmido pCIP51 con las enzimas *SspI* y *PstI* produce un fragmento que codifica para toda la región C-terminal de la lisozima CPL1 (aminoácidos 184-338) conservando, por tanto, los motivos repetidos P1 a P6 (apartado 2.4. de la Introducción). El fragmento *SspI*-*PstI* se insertó en la forma replicativa del DNA del bacteriófago M13gt103 cortada con *SmaI* y *PstI* y la mezcla de ligación se utilizó para transfectar células competentes de *E. coli* JM103. De entre los fagos recombinantes que originaban placas incoloras en presencia de X-GAL se aisló el DNA de uno de ellos (M13-CC10) que contenía el inserto *SspI*-*PstI*, según se pudo comprobar por análisis de restricción. Esta construcción permitió seguidamente la obtención del fragmento *c-cpl1* por digestión del DNA del recombinante M13-CC10 con las enzimas *EcoRI* y *BglII*, insertándose posteriormente en el plásmido hiperproductor pINIII-(*lppP*-5)-A3 (Inouye e Inouye, 1985) previamente cortado con *EcoRI* y *BamHI*. Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* RB791. Los clones que contenían el plásmido recombinante pCM1 (figura 21), cuando se cultivaron en presencia de lactosa al 2%, hiperproducían una proteína de peso molecular 18.000 (figura 22), valor éste similar al que cabría esperar para el dominio C-terminal (18.758 Da, 161 aminoácidos). La proteína codificada por el gen *c-cpl1* se denominará C-CPL1 a partir de este momento.

4.1.2. Purificación de la proteína C-CPL1

Si el dominio C-terminal fuera responsable de la interacción con la colina y pudiera adquirir una conformación correcta aun en ausencia de la región N-terminal, la proteína C-CPL1 debería poder purificarse en un solo paso en columnas de DEAE-celulosa (apartado 2.1.2).

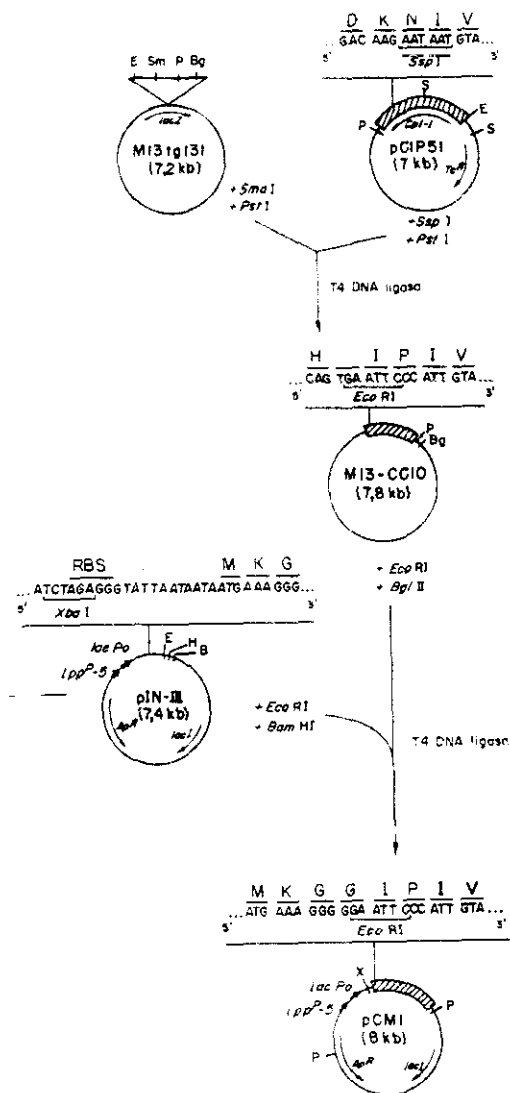


FIGURA 21. Construcción del plásmido pCMI.

Se muestran las secuencias de nucleótidos en donde se hallan las dianas de restricción de interés, así como la secuencia deducida de aminoácidos. Las enzimas de restricción se abrevian como sigue: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I; S, *Ssp*I; Sm, *Sma*I; X, *Xba*I. Otras abreviaturas: RBS, sitio de unión al ribosoma.

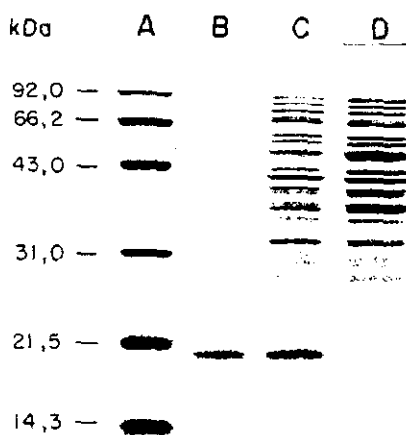


FIGURA 22. Purificación de la proteína C-CPLI por DEAE-celulosa. Calle A, marcadores de peso molecular; calle B, proteína C-CPLI purificada por DEAE-celulosa; calle C, extracto de un cultivo de *E. coli* RB791 [pCM1] inducido con lactosa al 2%; calle D, extracto de un cultivo de la misma cepa en ausencia de inductor. El gel de electroforesis en poliacrilamida-SDS era del 15%.

Cuando se cargó un extracto procedente de un cultivo de *E. coli* RB791 [pCMI] inducido con lactosa en una columna de DEAE-celulosa equilibrada en tampón fosfato 20mM pH 7.0, después de lavar la resina con NaCl 1.5 M se obtuvo la proteína C-CPLI en una forma electroforéticamente pura al añadir colina al 2% (figura 22). La proteína C-CPLI así purificada precipita cuando se dializa para eliminar la colina y sólo puede disolverse de nuevo en presencia de colina 70 mM.

La construcción del plásmido pCMI provoca la adición de 6 aminoácidos al dominio C-terminal. Para comprobar la precisión de esta construcción se llevó a cabo el análisis del extremo N-terminal de la proteína C-CPLI, obteniéndose la secuencia Met-Lys-Gly-Gly-Ile-Pro-Ile-Val, que coincide con la esperada.

4.1.3. Estudios de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular de la proteína C-CPLI se muestran en la figura 23. Los espectros presentan dos máximos a 225 y 265 nm y dos mínimos a 285 y 295 nm. La característica más sobresaliente de estos espectros es la presencia de una banda de elipticidad positiva a 225 nm, un caso muy poco frecuente en los espectros de proteínas pero que ha sido explicado en base a contribuciones de aminoácidos aromáticos (Brahms y Brahms, 1980). La peculiar forma del espectro de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano hace muy difícil la asignación del contenido de estructura secundaria de la proteína C-CPLI utilizando los parámetros habituales (Chang y cols, 1978; Bolotina y cols., 1980). Cuando se analizó el efecto de la colina sobre los espectros de dicroísmo circular de la proteína C-CPLI se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con la lisozima CPLI (figura 23). La adición de colina provoca, al igual que en el caso de la proteína completa, un aumento en las intensidades de las bandas centradas alrededor de 225 y 295 nm, con lo que se puede deducir que los cambios observados en el espectro de dicroísmo circular de la lisozima CPLI inducidos por colina son producto de la contribución del dominio C-terminal en el espectro total.

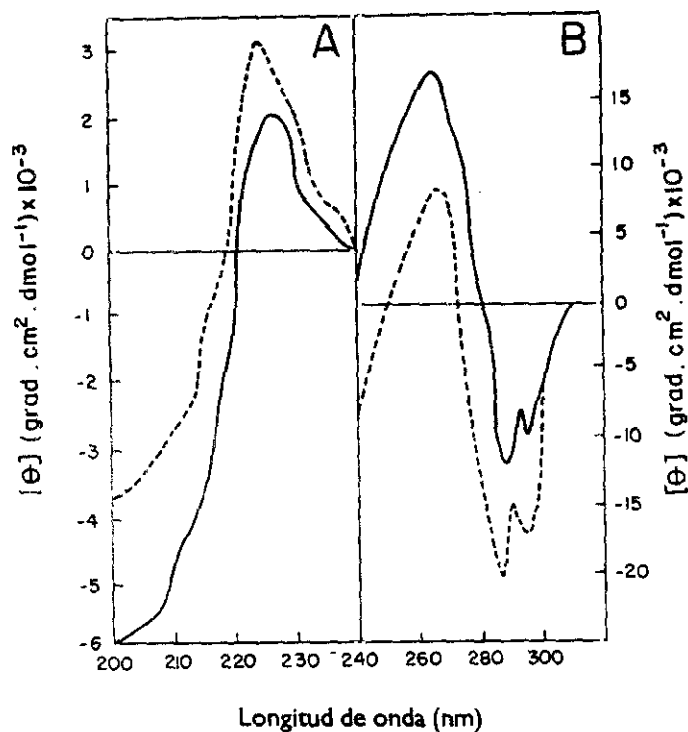


FIGURA 23. Espectros de dicroísmo circular de la proteína C-CPLI.

Panel A, región del ultravioleta lejano; panel B, región del ultravioleta cercano. En línea continua se muestra el espectro registrado en tampón fosfato 20 mM pH 7,0, mientras que en línea discontinua se muestra el espectro registrado en el mismo tampón en presencia de colina 10 mM. La concentración de proteína utilizada fue de 0,31 mg/ml.

4.1.4. Inhibición de la actividad lítica de las murein hidrolasas de neumococo por la proteína

C-CPLI

Los experimentos realizados hasta ahora demostraban que el dominio C-terminal de la lisozima CPLI era capaz de interaccionar específicamente con colina libre o con un análogo estructural como el DEAE. La proteína C-CPLI resultó ser totalmente inactiva en cuanto a la hidrólisis de la pared celular de neumococo; sin embargo parecía interesante comprobar si este polipéptido podría adsorberse a los residuos de colina presentes en los ácidos teicoicos de la pared de neumococo. Si esto fuera así, la actividad lítica de la amidasa LYTA o de la lisozima CPLI, que son dependientes de la presencia de residuos de colina en la pared, deberían resultar inhibidas por la proteína C-CPLI puesto que ésta competiría por la unión a los residuos de colina de la pared. En la tabla 5 se muestran estos resultados, comprobándose que la proteína C-CPLI es capaz de inhibir específicamente la acción de las enzimas líticas mencionadas.

4.1.5. Valoración de la cisteína libre de la proteína C-CPLI

Cuando se realiza la valoración de los grupos SH libres de la lisozima CPLI en condiciones no desnaturizantes se obtiene un valor límite de 1,7 que aumenta bruscamente a 3,0 cuando se añade SDS al ensayo (apartado 1.5.4). El mismo método aplicado a la valoración de la única cisteína del dominio C-CPLI (Cys-238 de la lisozima CPLI) indicó que ésta sólo puede llevarse a cabo en presencia de un agente desnaturizante como el SDS lo que sugiere que esta cisteína se encuentra inaccesible al DTNB tanto en el dominio C-CPLI como en la proteína entera. Un hecho que apoya esta hipótesis es el experimento de bloqueo de esta cisteína por ácido yodoacético (IAA). Cuando el dominio C-CPLI se incubaba con IAA en condiciones no desnaturizantes el grupo SH de la cisteína se valoraba perfectamente previa desnaturización de la proteína. Sin embargo, si la reacción con IAA se lleva a cabo en presencia de SDS la cisteína no puede valorarse con la misma eficacia, lo que indica que ha sido bloqueada por el IAA demostrando que la proteína necesita estar desplegada para que la cisteína pueda ser accesible a moléculas como el DTNB o el IAA.

TABLA 5. Inhibición de la actividad lítica sobre paredes celulares de neumococo por la proteína C-LYTA.

Adición	% de radiactividad liberada ^a	
	Amidasa LYTA	lisozima CPL I
Ninguna	100	100
Albúmina	100	100
HEWL	100	100
C-CPL I	16	24

^a Cada mezcla de reacción contenía inicialmente 0,1 nmoles del aditivo apropiado más 10 µl de suspensión de paredes de neumococo, preparadas como se describe en Materiales y Métodos, en un volumen final de 250 µl en tampón Tris-maleato 50 mM pH 6,9. Tras incubación a 4°C durante 5 minutos se añadió 0,1 pmol de lisozima CPL I o de amidasa LYTA. Las muestras se incubaron 10 minutos y se procesaron como se ha descrito. Cada valor es la media de tres experimentos independientes.

4.2. Obtención del dominio N-terminal de la lisozima CPLI (N-CPLI) por ingeniería genética

El esquema de la clonación de la secuencia que codifica para el dominio amino-terminal de la lisozima CPLI se muestra en la figura 24. El plásmido pCIP54 (Díaz y cols., 1990) contiene clonado el gen *cplI* en el que se ha producido artificialmente una mutación en la mitad del motivo PI creándose un sitio de restricción *SnaBI*. El plásmido citado se digirió con las enzimas *SnaBI* y *AsnI* y se convirtió en romo el corte producido por ésta última. Después se religó el plásmido y se transformaron células de *E. coli* HB101. De este modo la proteína resultante contendría los 209 primeros aminoácidos de la lisozima CPLI más un residuo de tirosina resultante de la fusión del gen $\Delta cplI$ con la secuencia del plásmido pCIP54. La selección de los clones que poseían el plásmido recombinante pCIP56 (figura 24) se llevó a cabo por análisis de restricción. Dado el bajo nivel de expresión del sistema no se procedió a la purificación del dominio N-terminal de la lisozima CPLI (denominado N-CPLI), pero la comprobación de que se estaba expresando una proteína de las características esperadas lo constituyó el experimento de "Western-blot" representado en la figura 25, en donde se puso de manifiesto que los clones de *E. coli* HB101 [pCIP56] expresaban una proteína de alrededor de 24.000 Da (lo esperado era 24.262 Da) que era reconocida por anticueros anti-CPLI.

4.2.1. Actividad de la proteína N-CPLI

Para comprobar si el dominio N-terminal de la lisozima CPLI retenía la actividad catalítica de la enzima completa se ensayaron extractos muy concentrados de *E. coli* HB101 [pCIP56] sobre paredes de neumococo que contenían colina o etanolamina en su composición. Los resultados presentados en la tabla 6 muestran que la proteína N-CPLI es capaz de hidrolizar paredes de neumococo que contienen colina, aunque con una eficiencia casi 20.000 veces menor que la enzima CPLI entera, demostrando así la importancia de la adquisición del dominio C-terminal para mejorar la eficiencia catalítica. La pérdida de actividad registrada sobre paredes con colina no se correlaciona con una pérdida de actividad similar sobre paredes de etanolamina, puesto que la proteína N-CPLI es capaz de hidrolizarlas con la misma eficiencia que la lisozima CPLI entera. Además, la enzima N-CPLI digiere los dos tipos de pared con una eficiencia

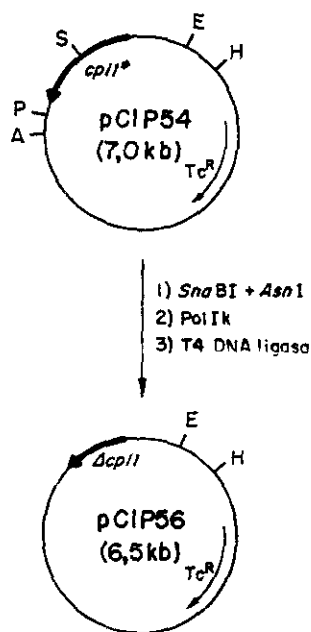


FIGURA 24. Construcción del plásmido pCIP56.

Enzimas de restricción: A, *Asn*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S, *Sma*BI; P, *Pst*I.

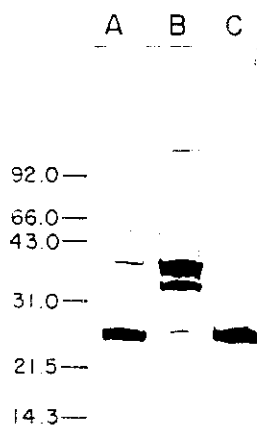


FIGURA 25. "Western-blot" del dominio N-terminal de la lisozima CPLI. El análisis se realizó en un gel de poliacrilamida-SDS al 15%. Las proteínas se hibridaron con antisuero anti-CPLI.

Calle A: Fragmento F1; Calle B: lisozima CPLI; Calle C: extracto de *E. coli* HB101 [pCIP56], que produce la proteína N-CPLI. Se indican los pesos moleculares de los marcadores en kilodalton. La doble banda que se observa en la calle B se debe a la degradación de la lisozima CPLI puesta de manifiesto en las condiciones de revelado del "Western-blot".

TABLA 6. Actividad enzimática comparada de los dominios N-terminales de las enzimas LYTA, CPL1 y CPL7 expresados en *E. coli*

Plásmido	Enzima ^b	Aminoalcohol en pared ^a		Relación colina/etanolamina
		Colina	Etanolamina	
pCIP54	CPL1	5947	0,33	18020
pCIP56	N-CPL1	0,17	0,29	0,58
pCP70	CPL7	347	157	2,2
pCIP72	N-CPL7	0,40	0,76	0,52
pGL100	LYTA	0,8x10 ⁶	66	11791
pGL300	N-LYTA	3,1	35	0,10

^a La mezcla de reacción contenía 200 µl del extracto correspondiente junto con tampón fosfato 20 mM, pH 6,0 y paredes de neumococo que contenían colina o etanolamina. Las actividades se dan en cpm liberadas en 6 horas por microgramo de extracto ensayado.

^b Enzima codificada por el plásmido representado en la columna anterior.

similar, lo que sugiere que ha perdido cualquier dependencia con respecto al aminoalcohol presente en los ácidos teicoicos de la pared.

4.3. Experimentos de proteolisis controlada

Con objeto de estudiar la estructura en dos dominios de las enzimas líticas de neumococo y sus bacteriófagos se procedió a determinar su sensibilidad frente a la digestión controlada con diferentes proteasas para comprobar la posible existencia de un núcleo de resistencia frente a la hidrólisis proteolítica.

4.3.1. Obtención de los dominios N-terminales de las lisozimas CPL1 y CPL7 (fragmentos F1 y F7) por digestión controlada con tripsina

En primer lugar se procedió a analizar la sensibilidad de las enzimas líticas de neumococo y sus bacteriófagos frente a la acción de la tripsina en las condiciones detalladas en Materiales y Métodos. Se pudo observar que mientras la amidasa LYTA era completamente digerida por tripsina a una relación proteasa/enzima de 1:60 (p/p) tras 60 minutos de incubación a 37°C, la hidrólisis de las lisozimas CPL1 y CPL7 en las mismas condiciones originaba como producto final unos fragmentos resistentes denominados F1 (24.000 Da) y F7 (25.000 Da) respectivamente (figura 26). Los polipéptidos F1 y F7 eran capaces de resistir digestiones más prolongadas o con mayor concentración de tripsina.

La cinética de degradación de las dos lisozimas por tripsina resultó ser muy distinta (figura 26). Mientras la digestión de la lisozima CPL1 originó el fragmento F1 sin productos intermedios incluso a tiempos muy cortos de digestión, la aparición del fragmento F7 fue simultánea a la aparición de otras dos especies intermedias. Esto último sugiere que la tripsina empieza a digerir a la lisozima CPL7 por tres puntos igualmente accesibles. Es importante señalar que la adición de colina 120 mM al ensayo de digestión de la enzima CPL1 es capaz de retrasar la aparición del fragmento F1 (figura 26), mientras que una concentración similar de NaCl no produjo un efecto apreciable en la digestión.

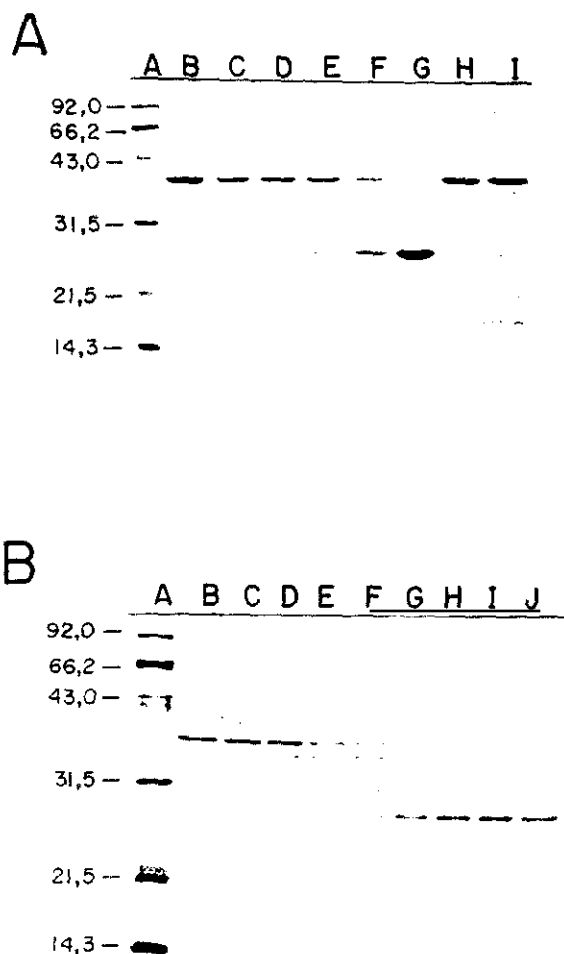


FIGURA 26. Digestión controlada de las lisozimas CPL1 y CPL7 con tripsina.

Las digestiones se llevaron a cabo en tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 a 37°C y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. **Panel A:** Digestión de la lisozima CPL1 a diferentes tiempos (relación proteasa/lisozima:1:100). Calle A: patrones de peso molecular; calles B-F: curso de la digestión a 0, 5, 10, 20 y 40 minutos. G: fragmento F1 purificado; calles H-I: digestión a los 10 y 40 minutos en presencia de 120 mM colina.

Panel B: Digestión de la lisozima CPL7 (relación proteasa/lisozima:1:25). A: marcadores de peso molecular; calles B-I: curso de la digestión a 0, 2, 5, 10, 30, 60, 90 y 120 minutos; calle J: fragmento F7 purificado. Los geles de electroforesis en poliacrilamida-SDS fueron del 15%.

Las proteínas F1 y F7 fueron purificadas a homogeneidad electroforética según se detalla en Materiales y Métodos. La mezcla de digestión se purificó por columnas de DEAE-celulosa para evitar una posible contaminación con la enzima CPL1 en la preparación final, ya que la enzima entera se retiene en la resina en las condiciones de elución utilizadas (apartado 2.1.2). Sin embargo esta afirmación no es necesariamente válida para la lisozima CPL7 por lo que, para garantizar completamente la pureza del fragmento F7, se estableció una segunda etapa de purificación mediante cromatografía de filtración en gel en Sephadex G-75. Cuando las proteínas F1 y F7 así purificadas se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS, se observó una única banda incluso cuando los geles se revelaron con el método de tinción por plata (datos no mostrados).

4.3.1.1. Análisis estructural de los polipéptidos F1 y F7

Para determinar qué región de las lisozimas CPL1 y CPL7 se conserva en los fragmentos F1 y F7 se procedió en primer lugar a la determinación de su secuencia amino-terminal de aminoácidos, obteniéndose para los dos casos la secuencia Val-Lys-Lys-Asn-Asp-Leu-Phe-Val, que coincide con la secuencia amino-terminal de las proteínas enteras, indicando que los fragmentos F1 y F7 constituyen la región N-terminal de las lisozimas CPL1 y CPL7 respectivamente. Con objeto de establecer el punto exacto de corte de la proteasa, se intentó determinar la secuencia C-terminal de las proteínas F1 y F7 mediante digestión con carboxipeptidasa Y, pero los fragmentos fueron resistentes a la degradación por esta proteasa incluso en presencia de urea 6 M. Por tanto, para poder determinar el sitio de digestión límite hubo que recurrir a métodos indirectos.

En la figura 25 se muestra el resultado del experimento de "Western-blot" del fragmento F1, la lisozima CPL1 y un extracto de *E. coli* HB101 [pCIP56], que produce el dominio N-CPL1, revelado con antisueros anti-lisozima CPL1. Puede observarse que las tres proteínas son reconocidas por el antisuero y que la banda correspondiente al fragmento F1 tiene la misma movilidad electroforética que la de la banda de la proteína N-CPL1, lo que sugiere que ambas tienen un peso molecular muy similar. Teniendo en cuenta la construcción del plásmido pCIP56 (figura 24), se puede concluir que el extremo C-terminal del fragmento F1 debe de encontrarse próximo a la mitad del motivo P1, como ocurre con la proteína N-CPL1. Un resultado similar se

obtuvo con el fragmento F7 y el dominio N-terminal de la lisozima CPL7 (N-CPL7) cuya secuencia se encuentra clonada en el plásmido pCIP72 (Díaz, 1991). Sin embargo, a pesar de la similitud existente entre los dominios N-terminales de las lisozimas CPL1 y CPL7, el antisuero anti-CPL1 no reconoció con suficiente eficacia a las proteínas derivadas de la lisozima CPL7 y las bandas de hibridación fueron apenas visibles en las membranas de nitrocelulosa.

Otro método indirecto para determinar el extremo C-terminal del fragmento F1 consistió en el análisis de las cisteínas libres de la proteína. Como se ha visto anteriormente (apartado 1.5.4) la lisozima CPL1 tiene sus tres cisteínas libres. Una de estas cisteínas (Cys-238) podría estar próxima al posible punto de corte por tripsina. El análisis de cisteínas libres en presencia de SDS del fragmento F1 mostró un valor de 1,7 cisteínas por molécula asumiendo para ésta el peso molecular obtenido a partir de la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (aproximadamente 24.000 Da) (figura 26), por lo que el punto de corte debería de encontrarse antes de la cisteína mencionada. Aprovechando el alto contenido en aminoácidos aromáticos en la zona prevista de corte (alrededor de la mitad del motivo P1), se calculó el coeficiente de extinción molar de cada uno de los polipéptidos que podrían resultar de la acción de la tripsina (tabla 7). Usando estos datos se calcularon los grupos SH por molécula de proteína. Los valores más cercanos a dos se obtuvieron para los fragmentos cuyo extremo se encontraría entre la lisina 203 y la lisina 222, lo que estaría de acuerdo con el peso molecular aparente calculado en geles de poliacrilamida-SDS. La ausencia de aminoácidos aromáticos en la zona prevista de corte para la lisozima CPL7 impidieron determinar por este método la posición del extremo del fragmento F7, puesto que apenas varía el coeficiente de extinción molar de cada uno de los posibles fragmentos.

4.3.1.2. Análisis funcional de las proteínas F1 y F7

Teniendo en cuenta que los dominios N-terminales de las dos lisozimas producidos por ingeniería genética son activos, cabría esperar que las proteínas F1 y F7 correspondientes también a los módulos N-terminales de las lisozimas CPL1 y CPL7 pudieran poseer asimismo actividad catalítica a pesar de carecer del dominio C-terminal. Para comprobar esta hipótesis se ensayó su actividad catalítica sobre paredes de neumococo que contenían colina o etanolamina (tabla 8). Los dos polipéptidos F1 y F7 conservan actividad hidrolítica sobre paredes de

TABLA 7. Extremos C-terminales probables del fragmento FI

Punto de corte ^a	M _r ^b	ε ₂₈₀ ^c	Cociente Cys/molécula ^d
Lys-182	20.654	32.246	1,5
Lys-194	22.124	32.246	1,5
Lys-196	22.367	32.246	1,5
Lys-202	23.029	37.805	1,7
Lys-206	23.505	37.805	1,7
Arg-211	24.255	48.923	2,2
Arg-212	24.429	48.923	2,2
Lys-221	25.468	50.120	2,3
Lys-224	25.929	55.679	2,5
Lys-235	27.262	63.632	2,9
Lys-245	28.460	70.388	3,2
Lys-249	28.964	70.388	3,2
Lys-254	29.807	78.341	3,6

^a Posición del punto de corte de la tripsina referido a la lisozima CPL I.

^b Peso molecular correspondiente al fragmento resultante.

^c Coeficiente de extinción molar teórico calculado en base a la composición en aminoácidos aromáticos utilizando los parámetros de Fasman (1976).

^d Se realizó una valoración de grupos SH libres sobre una muestra del fragmento FI purificado cuya absorbancia a 280 nm era de 1,082, obteniéndose un valor de $A_{412}=0,68$, correspondiente a $[SH] \approx 5 \times 10^{-5}$ M. Después se dividió este valor por la concentración molar de proteína calculada en base al valor de absorbancia y a su coeficiente de extinción molar teórico, obteniéndose una estimación del contenido en cisteínas libres de los polipéptidos.

TABLA 8. Actividad enzimática comparada de los fragmentos F1 y F7 resistentes a la proteólisis por tripsina

Enzima	Aminoalcohol en pared ^a		Relación colina/etanolamina
	Colina	Étanolamina	
CPL1	12x10 ⁶	697	17210
F1	105	233	0,45
CPL7	1,1x10 ⁶	0,8x10 ⁶	1,3
F7	132	444	0,30

^a Los ensayos se realizaron en tampón fosfato 20 mM, pH 6,0 sobre paredes de neumococo que contenían colina o etanolamina en su composición. La actividad enzimática viene dada en cpm liberadas tras 6 horas de ensayo por microgramo de proteína en el ensayo.

neumococo, igual que en el caso de las proteínas N-CPLI y N-CPL7, su actividad resultó ser relativamente independiente del tipo de aminoalcohol presente en los ácidos teicoicos de la pared, lo que en el caso de la proteína F1 descarta una posible contaminación de este fragmento con la enzima CPLI completa. El fragmento F1 es unas 10.000 veces menos activo que la enzima entera CPLI en los ensayos con paredes que contienen colina, pero conserva un grado comparable de actividad sobre paredes que contienen etanolamina. El fragmento F7 presenta una actividad drásticamente disminuida con respecto a la lisozima CPL7 sobre los dos tipos de paredes, si bien ésta resultó ser de la misma magnitud que la presentada por el fragmento F1. Estos resultados confirman la hipótesis sobre la funcionalidad del dominio N-terminal de estas proteínas y sobre la importancia del dominio C-terminal en la adquisición de una mayor especificidad y eficacia catalítica.

Algunas de las características bioquímicas de los fragmentos F1 y F7 se muestran en la figura 27. Pese a la baja actividad que muestran estas proteínas con respecto a las enzimas completas, el método altamente sensible del que se dispone para analizar tales actividades puso de manifiesto, como era previsible, que las dos proteínas seguían comportándose como muramidasa, según puso de manifiesto el análisis de los productos de degradación de paredes de neumococo (figura 27A) (García y cols., 1987). El pH óptimo para la actividad del fragmento F1 se situó en 5,0 (figura 27B), el mismo que el de la proteína entera. Por su parte, el fragmento F7 tiene su pH óptimo de actuación a pH 4,75 (figura 27B), al igual que el de la enzima CPL7. La actividad enzimática de los polipéptidos F1 y F7 se inhibía a bajas concentraciones de fuerza iónica al igual que la lisozima CPL7, pero no la lisozima CPLI (figura 27C). Como se puede observar en la figura 28, el efecto de la fuerza iónica sobre la estructura secundaria del fragmento F1 es mínimo, pues no se aprecia ningún cambio conformacional detectado en el espectro de diroismo circular. La actividad de los dos fragmentos no resultó inhibida específicamente por colina sino tan sólo por el efecto salino inespecífico debido a la concentración de esta molécula en el ensayo.

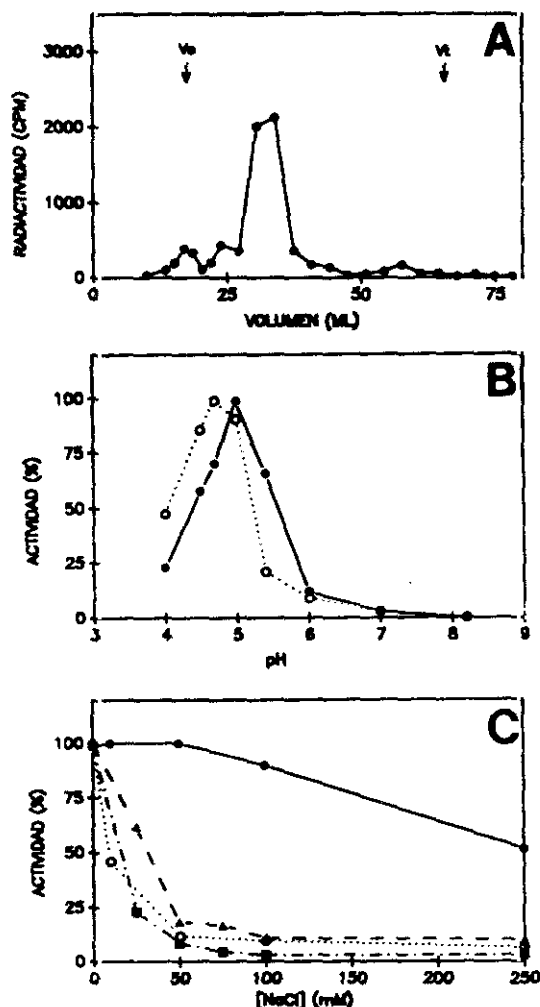


FIGURA 27. Características bioquímicas comparadas de las lisozimas CPL1 y CPL7 y los fragmentos F1 y F7.

Panel A. análisis de los productos de degradación de la digestión de paredes celulares de neumococo marcadas con colina radiactiva por medio del fragmento F1. Las paredes digeridas se cromatografiaron en una columna de Sephadex G-75 y se contó la radiactividad de 400 μ l de cada fracción recogida, que constaba de 1,44 ml. V_0 , volumen de exclusión de la columna. V_t , volumen total.

Panel B. actividad enzimática con respecto al pH. (●—●), F1; (○····○), F7.

Panel C. Inhibición de la actividad enzimática con la fuerza iónica. (●—●), CPL1; (○····○), CPL7; (■---■), F1; (▲---▲), F7. Los ensayos se realizaron en tampón fosfato 20 mM pH 6,0, y la actividad se refiere al dato obtenido a 0 mM NaCl.

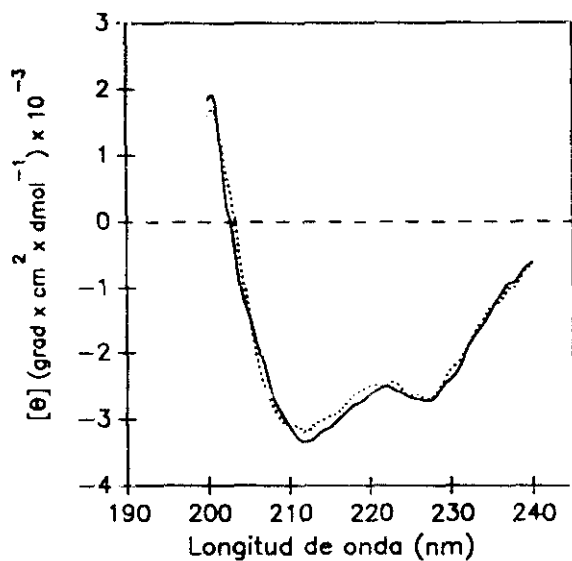


FIGURA 28. Espectro de dicroísmo circular del fragmento FI en la región del ultravioleta lejano.

Se usó una concentración de 0,26 mg/ml de proteína FI, y se registró el espectro: (—), en tampón fosfato 20 mM pH 7,0; (·····), en tampón fosfato conteniendo 100 mM NaCl.

4.3.2 Digestión con otras enzimas proteolíticas

La sensibilidad de las enzimas líticas de neumococo y sus bacteriófagos Cp-1 y Cp-7 frente a la acción de otras proteasas también fue estudiada. La digestión de la lisozima CPL1 con α -quimotripsina (1:30 p/p) durante 60 minutos a 37°C originó la aparición de un fragmento resistente de tamaño ligeramente superior al del polipéptido F1 ($M_r = 26.000$) (figura 29). Este fragmento demostró ser también muy resistente a la acción de la quimotripsina puesto que una incubación más prolongada o el uso de mayores cantidades de proteasa generaron resultados similares. Sin embargo, la amidasa LYTA y la lisozima CPL7 fueron más sensibles a la digestión en estas condiciones, no pudiendo aislarse un fragmento resistente. Igual que en la digestión con tripsina, la hidrólisis de la lisozima CPL1 por quimotripsina se retrasa cuando se añade al medio colina; este comportamiento se explicaría en base a que el cambio conformacional producido en el dominio C-terminal subsiguiente a la adición del ligando le confiere a esta región una mayor resistencia a la acción proteolítica. Por último, los ensayos de digestión con proteinasa K mostraron que todas las enzimas estudiadas resultaron ser muy susceptibles a esta proteasa puesto que, a una concentración de 1:30 (p/p), las enzimas fueron completamente hidrolizadas en 120 minutos de incubación. Usando concentraciones más bajas de proteinasa K (1:100 p/p) en la digestión de la lisozima CPL1 se pudo observar, tras 60 minutos de incubación, la aparición de un fragmento de un peso molecular similar al del fragmento F1, pero que desapareció cuando la incubación se prolongó dos horas más, por lo que no cabe calificarlo de resistente a la proteinasa K.

4.4. Estudios calorimétricos de la estabilidad térmica de la lisozima CPL1

4.4.1. Estudios de DSC sobre la proteína completa

La estabilidad térmica de la lisozima CPL1 se estudió por calorimetría diferencial de barrido (DSC). En la figura 30 se ha representado la curva experimental obtenida para la proteína a pH 7,0, utilizando una velocidad de barrido de 30°C/hora, tras corrección de la línea base. El perfil de la curva muestra una transición centrada a 43°C y un hombro a una temperatura de aproximadamente 50°C. La reversibilidad de la transición térmica se estudió analizando la señal

RESULTADOS

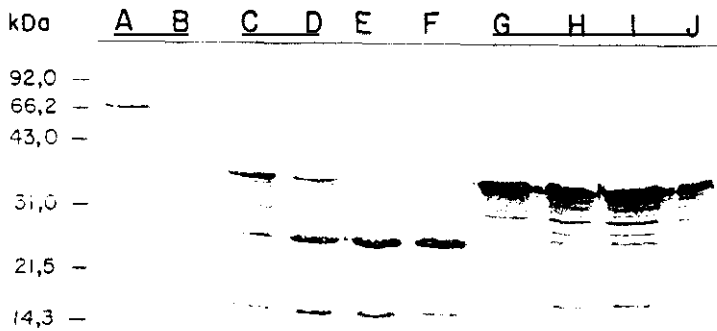


FIGURA 29. Digestión controlada de la lisozima CPLI con α -quimotripsina. La digestión se llevó a cabo en tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 a 37°C con una relación proceasa/lisozima de 1:30, y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. Calle A: Marcadores de peso molecular; calles B-F, curso de la digestión a 0, 5, 15, 30 y 60 minutos; calles G-J, digestión a 5, 15, 30 y 60 minutos en presencia de 125 mM colina. El gel de electroforesis en poliacrilamida-SDS era del 15%.

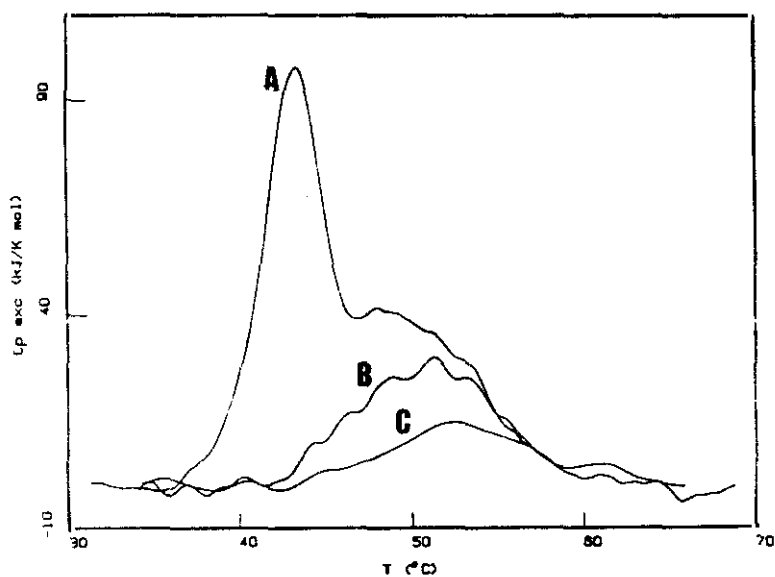


FIGURA 30. Reversibilidad de la desnaturalización térmica de la lisozima CPLI analizada por DSC. La proteína se sometió a calentamiento hasta una determinada temperatura, dejándose enfriar y calentando una segunda vez. **A**, curva de capacidades caloríficas de la lisozima CPLI; **B**, después de detener el primer calentamiento a 46°C; **C**, después de detener el primer calentamiento a 56°C.

obtenida en un segundo barrido tras detener el primero a distintas temperaturas (figura 30). Cuando el primer calentamiento se detuvo a 46°C solamente se reprodujo después la señal correspondiente al segundo pico. Cuando se llegó a los 51°C se observó que esta transición todavía era reversible en un 90%. Sin embargo, ya el calentamiento hasta 56°C reducía la reversibilidad hasta el 54%. Por último, cuando el primer barrido llegaba a temperaturas superiores a las de la transición no se obtuvo ninguna señal al proceder al segundo calentamiento.

Las curvas de capacidad calorífica obtenidas utilizando diferentes velocidades de barrido (30, 60 y 90°C/hora) no presentaban variaciones significativas ni en la forma ni en la entalpía de transición, por lo que puede descartarse una influencia significativa de la etapa irreversible en la función ΔC_p , lo que permite analizar las curvas aplicando las ecuaciones obtenidas en condiciones de equilibrio. Así, la deconvolución de la curva de capacidades caloríficas mediante el algoritmo de Freire y Biltonen (1978a, b, c) muestra la existencia de dos transiciones entre dos estados cuyas T_m son de 43,5°C y 51,4°C respectivamente (figura 31). En la tabla 9 se encuentran recogidos los parámetros termodinámicos obtenidos para cada una de las transiciones. La existencia de las mismas podría indicar la presencia de dos dominios estructurales que funden independientemente a dichas temperaturas.

4.4.1.1. Efecto del pH

Las curvas obtenidas a diferentes pHs se representan en la figura 32, y los parámetros que de ellas se derivan se muestran en la tabla 10. La entalpía total no varía significativamente con el pH. La deconvolución de las curvas indica que el aumento del pH provoca un fuerte aumento en la entalpía de la primera transición; por otra parte, la segunda transición contribuye casi con el 50% a la entalpía total de desnaturalización de la lisozima CPL1 a pH 6,0, mientras que desaparece casi totalmente a pH 8,0. No pudieron obtenerse datos por debajo de pH 6,0 debido a que la proteína precipitaba a la concentración utilizada.

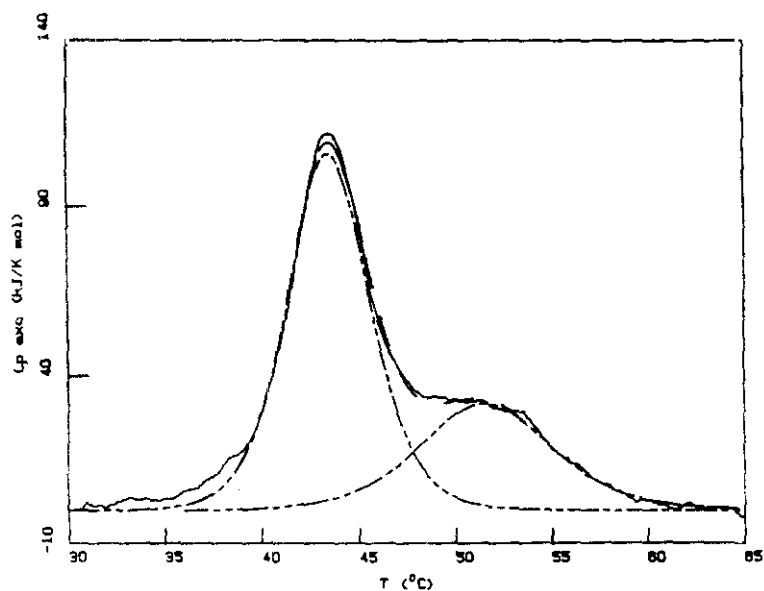


FIGURA 31. Deconvolución de la curva de desnaturalización térmica de la lisozima CPL I. (—), curva experimental; (· · · · ·), perfil de las transiciones que resultan de la deconvolución de la curva experimental; (---), envolvente teórica de las dos transiciones.

TABLA 9. Características termodinámicas de las proteínas CPLI, C-CPLI y FI a pH 7,0.

Especie	Colina (mM)	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H_o(\text{kJ mol}^{-1})$	$\Delta H_{\text{VH}}(\text{kJ mol}^{-1})$	$\Delta H_o/\Delta H_{\text{VH}}$
CPLI	0	43,5	894	418	2,1
-Transición 1 ^a	0	43,5	564	618	0,9
-Transición 2	0	51,4	309	359	0,9
C-CPLI	0	42,9	455	969	0,5
FI ^b	0	52,1	725	504	1,4
CPLI	10	51,5	994	1479	0,7
-Transición 1	10	51,3	949	1529	0,6
-Transición 2	10	N.D. ^c	N.D.	N.D.	N.D.
C-CPLI	10	51,9	614	1212	0,5
FI	10	52,4	893	445	2,0

^a Transiciones determinadas a partir de la deconvolución de la curva.

^b Datos de la media de tres experimentos

^c N.D.: No determinado.

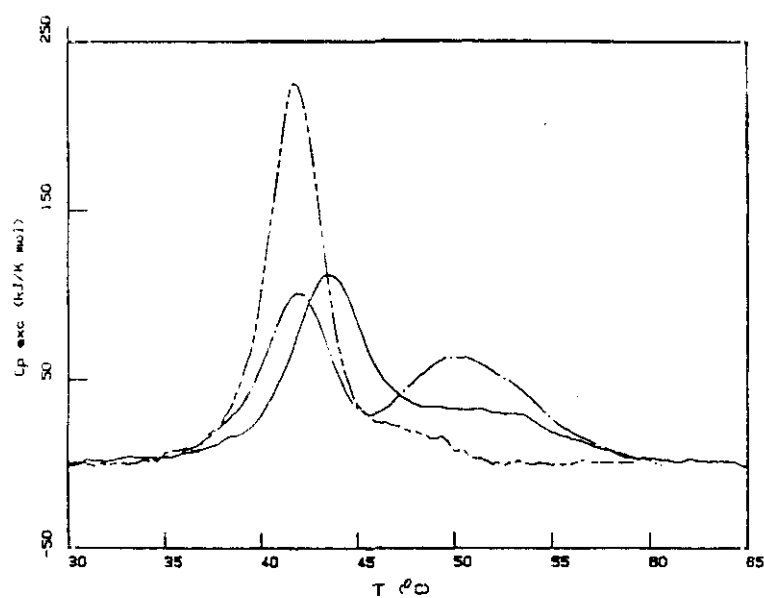


FIGURA 32. Influencia del pH sobre la desnaturalización térmica de la lisozima CPLI.
Curvas de DSC registradas: (---) a pH 6,0; (—), a pH 7,0; (- · - · -) a pH 8,0.

TABLA 10. Parámetros termodinámicos de la lisozima CPLI y del fragmento FI a diferentes pHs

pH	CPLI		Transición 1 ^a		Transición 2		FI	
	T_m	ΔH_o	T_m	ΔH_o	T_m	ΔH_o	T_m	ΔH_o
6,0	41,9	1011	41,8	468	50,7	535	61,0	1483
7,0	43,5	894	43,5	564	51,4	309	53,9	873
8,0	41,8	957	41,8	870	47,6	104	49,2	777

^a Transiciones determinadas a partir de la deconvolución de la curva.

^b Grados centígrados.

^c Entalpía calorimétrica, en kJ mol^{-1} .

4.4.2. Estudios sobre el dominio C-terminal

Con objeto de comprobar si las dos transiciones de la lisozima CPLI podrían asignarse a cada uno de los dos dominios funcionales de la proteína (N- y C-terminales), se realizó en primer lugar el estudio por DSC de la proteína C-CPLI, correspondiente al dominio C-terminal (figura 33). Del termograma se dedujo una única transición con una entalpía de desnaturalización de 455 kJ mol^{-1} y cuya T_m era de $42,9^\circ\text{C}$. (tabla 9). Por tanto, la primera de las dos transiciones de la lisozima CPLI ($T_m = 43,5^\circ\text{C}$) podría corresponder al dominio C-terminal de la proteína. La asignación del primer pico a la desnaturalización térmica del dominio C-terminal se confirmó en base a los resultados obtenidos en presencia de colina, tal y como se mostrará en el apartado 4.4.4. más adelante.

4.4.3. Estudios sobre el dominio N-terminal

Para proseguir con el estudio del dominio N-terminal de la lisozima CPLI habría que realizar el mismo tipo de estudios del apartado anterior con la proteína N-CPLI (apartado 4.2). Sin embargo ésta se obtiene con muy bajo rendimiento, lo que constituye un obstáculo para la realización de estos experimentos. No obstante, ciertas características del dominio N-terminal pueden estudiarse utilizando el fragmento F1 (apartado 4.3.1.) puesto que esta proteína se corresponde con dicha región, a pesar de la indefinición de su extremo C-terminal.

El perfil de las curvas de capacidades caloríficas obtenidas en la desnaturalización térmica del fragmento F1 variaba en cierta medida de unas preparaciones a otras, a pesar de que no existía heterogeneidad en las muestras según mostraban los resultados de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Asimismo, la forma de los termogramas no indicaba una única transición entre dos estados (figura 34). Con todo, del análisis de las curvas se pueden obtener datos de interés (tabla 9). Su T_m calculada a pH 7,0 se sitúa en torno a los 52°C , valor muy parecido al calculado para la segunda transición de la lisozima CPLI completa ($51,4^\circ\text{C}$), siendo además independiente de la presencia de colina. Puesto que los parámetros de la segunda transición de la lisozima CPLI son dependientes del pH (figura 32, tabla 10), se procedió a estudiar el efecto del mismo sobre la desnaturalización térmica del fragmento F1, obteniéndose los resultados que se muestran en la

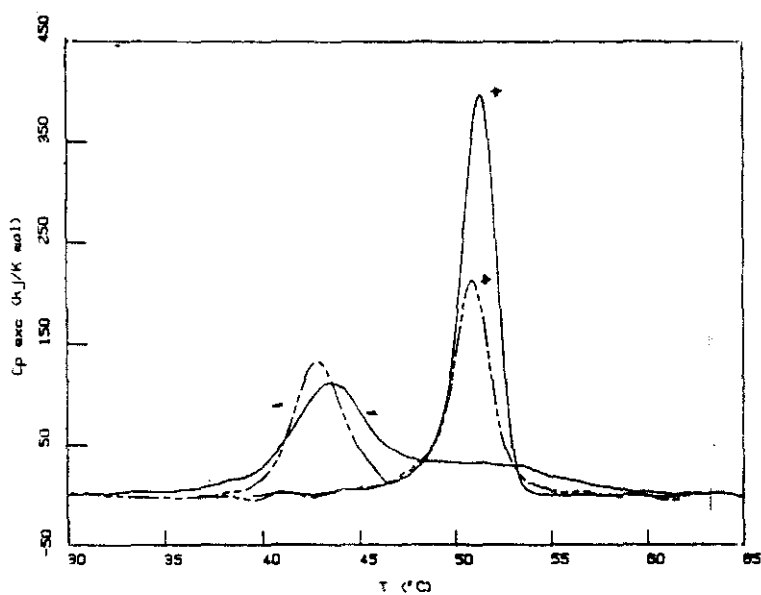


FIGURA 33. Perfil de desnaturalización térmica del dominio C-terminal de la lisozima CPLI por DSC.

(—), curva de la lisozima CPLI completa; (---), curva de la proteína C-CPLI, correspondiente al dominio C-terminal. (—) significa en ausencia de colina, y (+) significa en presencia de 10 mM colina.

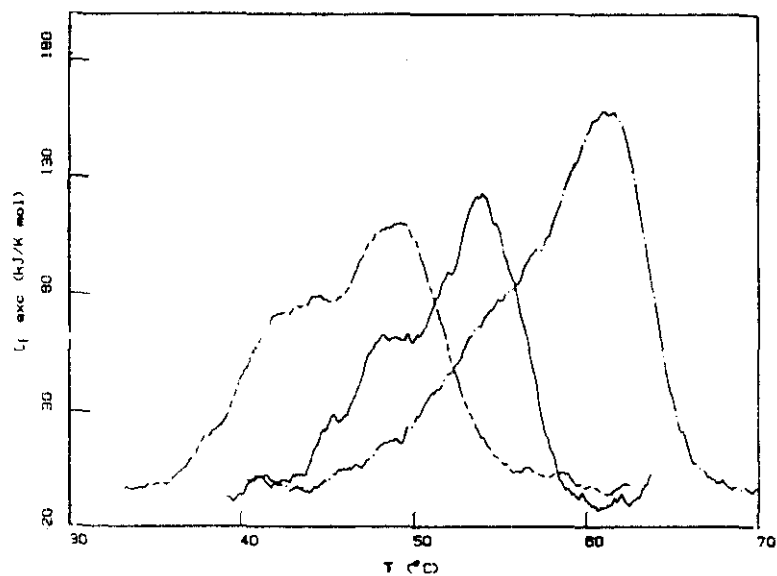


FIGURA 34. Influencia del pH en la desnaturalización térmica del fragmento FI. Se representa la curva de DSC del fragmento FI: (---), a pH 6,0; (—), a pH 7,0; (- · - · -), a pH 8,0.

figura 34 y en la tabla 10. Mientras que a pH 7,0 y 8,0 la T_m de la proteína F1 es bastante similar a la T_m de la primera transición de la lisozima completa, las mayores diferencias se observan a pH 6,0. El valor de la T_m a este pH (61°C) es considerablemente mayor que el calculado para este dominio dentro de la lisozima CPL1 (50,7°C) (tabla 5), debido posiblemente a la existencia de alguna interacción desestabilizadora con el dominio C-terminal que se pone de manifiesto a este pH.

4.4.4. Efecto de la colina sobre la desnaturalización térmica de la lisozima CPL1.

En la figura 35 se representan las curvas de absorción de calor obtenidas en presencia de concentraciones crecientes de colina. Como puede observarse, la unión del ligando induce un aumento de la variación de la entalpía de desnaturalización y un desplazamiento en la T_m del primer pico hacia temperaturas más altas. Hay que señalar también la existencia de una disminución en la intensidad del pico correspondiente a la segunda transición, particularmente visible a bajas concentraciones de colina. Cuando la concentración de colina es de 20 mM sólo se observa un pico cuya T_m es de 51,5°C. La adición de NaCl 0,2 M en lugar de colina no produjo ningún cambio apreciable en el perfil de la curva referente a la lisozima, de lo que se deduce que el cambio observado en presencia de colina es debido a una interacción específica de este ligando con la lisozima CPL1. Por otra parte, el termograma de la proteína purificada por cromatografía de penetrabilidad en lugar de DEAE-celulosa resultó ser idéntico al de la proteína purificada por este último procedimiento, lo que prueba que tras la diálisis de la proteína no permanece unida ninguna molécula de colina.

Es muy importante señalar que la adición de colina a la proteína C-CPL1 provocó en el perfil de desnaturalización térmica de ésta unos cambios similares a los de la primera de las transiciones de la lisozima CPL1 (figura 33), lo que apoya la hipótesis de que esta transición corresponde al dominio C-terminal de la proteína.

La desnaturalización térmica de la lisozima CPL1 en presencia de colina resultó ser parcialmente irreversible cuando el primer calentamiento se detuvo en temperaturas a las que no había concluido la transición, y cuando se completaba ésta en el primer barrido no se observaba

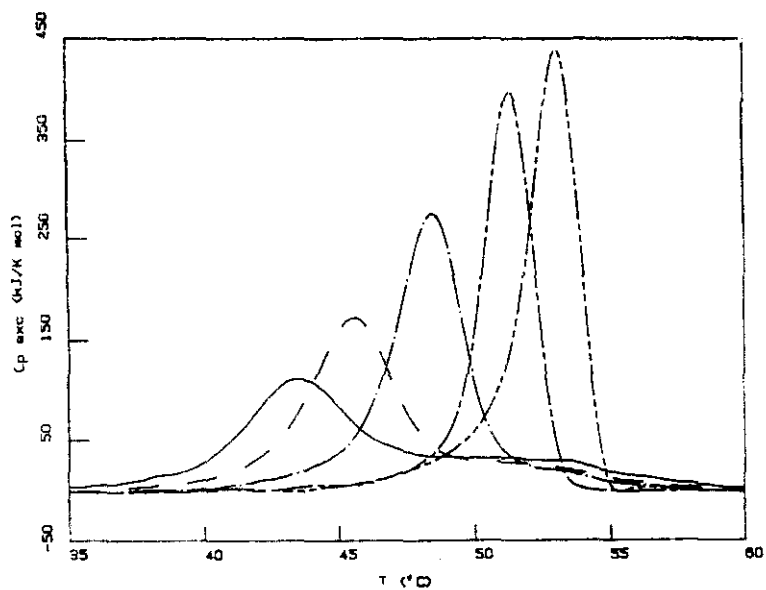


FIGURA 35. Variación del perfil de DSC de la lisozima CPLI con colina. Las curvas se obtuvieron en presencia de distintas concentraciones de colina: (—), 0 mM; (-----), 2 mM; (- · - · -), 5 mM; (- - - -), 10 mM; (- · · - ·), 20 mM.

ninguna señal al proceder al segundo calentamiento. Sin embargo tampoco se observó ninguna influencia apreciable de la velocidad de barrido en el perfil de desnaturalización térmica de la proteína en estas condiciones, es decir, no existe control cinético de la transición, por lo que cabe suponer que el proceso irreversible no ejerce influencia sobre el equilibrio de interacción con el ligando, lo cual posibilita analizar la unión de colina a la proteína según el método de Fukada y cols. (1983). Por tanto, se construyó el diagrama de van't Hoff que se muestra en la figura 36. Los datos experimentales se ajustan a una recta con bastante precisión; de la pendiente de esta recta se puede calcular un número de 3,8 sitios de unión de colina en la lisozima CPL I.

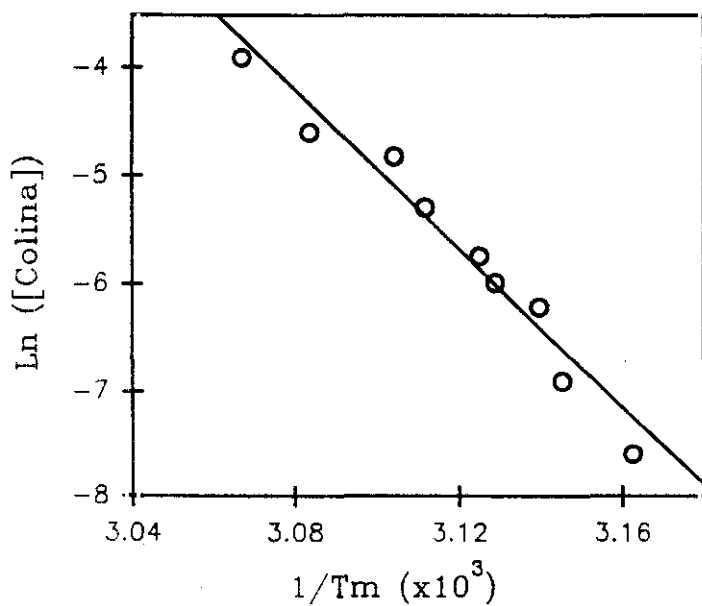


FIGURA 36. Diagrama de van't Hoff para la unión de colina a la lisozima CPLI.

Los datos de DSC se ajustaron a la ecuación $\Delta H_{VH}/RT_m + n \ln(L_0) = \text{constante}$, donde n es el número de sitios de unión del ligando y L_0 es la concentración de ligando libre. El valor de ΔH_{VH} es de 994 kJ mol^{-1} .

5. MECANISMO DE REACCION DE LA LISOZIMA CPLI

5.1. Mutagénesis dirigida del gen *cplI*

Los resultados que se presentan en este apartado tratan de poner de manifiesto la implicación directa de los aminoácidos Asp-9 y Glu-36 de la lisozima CPLI en el mecanismo catalítico. Un problema que suele aparecer con cierta frecuencia cuando se realiza un experimento de mutagénesis dirigida es la aparición de artefactos en el proceso de manipulación genética que pueden conducir a la aparición de mutaciones indeseadas en otras partes del gen. Por ello, nos propusimos secuenciar el fragmento sobre el que se llevaría a cabo la mutagénesis con objeto de eliminar por completo la posibilidad de aparición de dichas mutaciones indeseadas. Por esta razón, se procedió a la clonación de un fragmento del gen *cplI* que, conteniendo la región de interés (la correspondiente a los aminoácidos 9 y 36), fuera lo suficientemente corto como para poder secuenciarlo sin grandes dificultades. La existencia de un sitio *SphI* en la posición 321 del gen posibilita la obtención de un fragmento que cumple estas condiciones.

El proceso de mutagénesis dirigida de la región 5' del gen *cplI* se muestra esquematizado en la figura 37. Para ello se utilizó el método descrito por Sayers y cols. (1988). Tanto el plásmido pCIP100 (apartado 2.1.) como la forma replicativa del DNA del fago M13tg130 fueron digeridos con *XbaI* y *SphI*, y con la mezcla de ligación se procedió a transfectar células competentes de *E. coli* TGI. Las placas incoloras indicaron la presencia de fagos M13 recombinantes de los que se aisló su DNA. Tras un análisis por enzimas de restricción y posterior secuenciación del fragmento insertado, se eligió el clon número 9 (M13-XC9), sobre el que se llevó a cabo la mutagénesis.

5.1.1. Introducción de aminoácidos polares

Con objeto de sustituir los aminoácidos Asp-9 y Glu-36 por distintos aminoácidos, se sintetizaron los oligonucleótidos degenerados que se muestran en la tabla 11. De este modo, en cada una de las posiciones 9 y 36 se incluirían los aminoácidos Asp, Asn, Glu, Gln, His y Lys. Estos aminoácidos poseen una serie de propiedades de carga, polaridad y tamaño lo

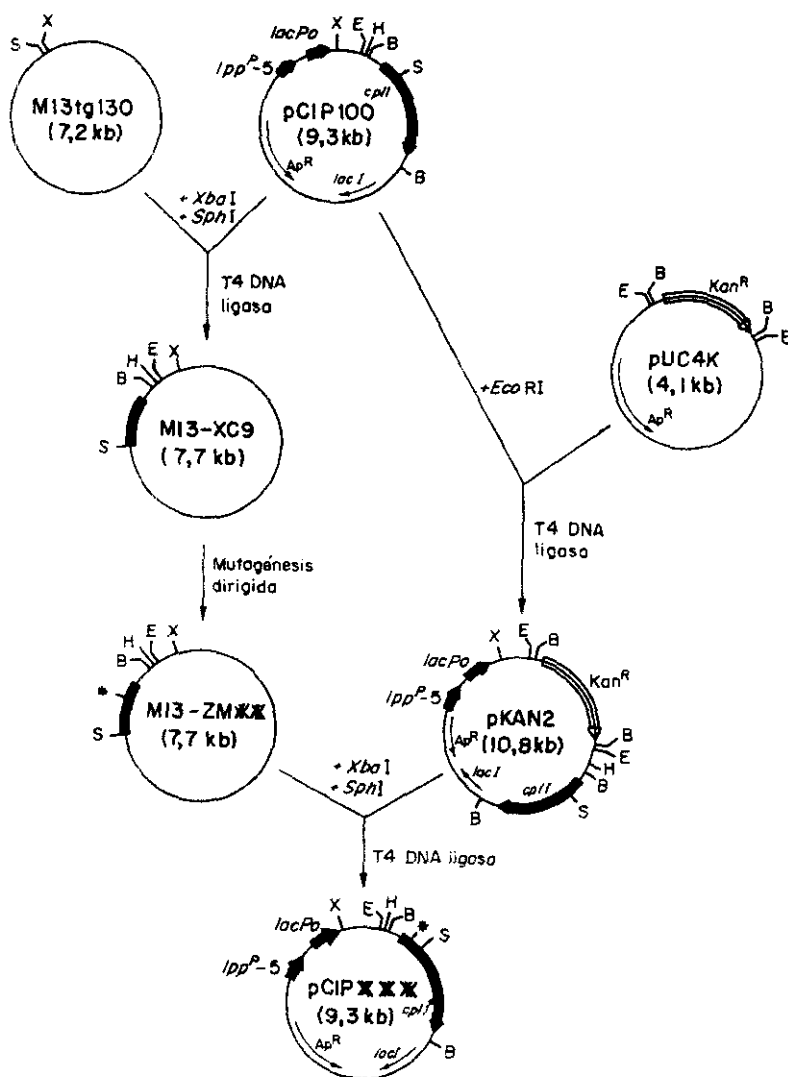


FIGURA 37. Mutagénesis dirigida del gen *cplI*.

Enzimas de restricción indicadas: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S, *Sph*I; X, *Xba*I. El asterisco (*) indica el lugar de la mutación. Los símbolos *** denotan la presencia de plásmidos con la misma construcción pero diferentes mutaciones, cuya identificación se encuentra en el texto.

TABLA II. Oligonucleótidos diseñados para la mutagénesis dirigida del gen *cplI*

OLIGONUCLEOTIDO	MUTACION					
5'-GATTTATTTGTA <table><tr><td>A</td></tr><tr><td>G</td></tr><tr><td>C</td></tr></table> A <table><tr><td>A</td></tr><tr><td>C</td></tr></table> GTTTCAGTCAC-3'	A	G	C	A	C	Asp-9→ Asp, Asn, Glu, Gln, His, Lys
A						
G						
C						
A						
C						
5'-CATTAAAATTTCT <table><tr><td>A</td></tr><tr><td>G</td></tr><tr><td>C</td></tr></table> A <table><tr><td>A</td></tr><tr><td>C</td></tr></table> AGTACGACC-3'	A	G	C	A	C	Glu-36→ Asp, Asn, Glu, Gln, His, Lys
A						
G						
C						
A						
C						
5'-TATTTGTA GCT GTTTCAG-3'	Asp-9→ Ala					
5'-AAATTTCT GCA AGTACGAC-3'	Glu-36→ Ala					

suficientemente heterogéneas como para poder obtener algunas conclusiones sobre el centro activo de la lisozima CPL I.

La obtención de las enzimas mutantes en grandes cantidades es un requisito indispensable cuando se quieren estudiar características estructurales de estas proteínas. Por ello se pensó en la construcción de un plásmido similar al pCIP100 en el que el gen salvaje fuera sustituido por el mutante. La clonación directa del fragmento *XbaI-SphI* en el plásmido pCIP100 presenta la dificultad de distinguir el gen mutante del gen salvaje. Por ello se procedió a la construcción de un sistema que permitiera la selección directa e inequívoca de plásmidos con una construcción similar al pCIP100. Así, se extrajo el gen de resistencia a kanamicina del plásmido pUC4K mediante digestión con *EcoRI*, y se insertó en el plásmido pCIP100 cortado con la misma enzima, obteniéndose el plásmido recombinante pKAN2 (figura 37). Las células de *E. coli* HB101 que contenían este plásmido eran resistentes a ampicilina y kanamicina. Como se puede ver en la figura 37, la donación del fragmento *XbaI-SphI* mutante en el mismo sitio del pKAN2 conduce a la desaparición de la resistencia a kanamicina, por lo que la selección de recombinantes es sencilla. De este modo, se obtuvieron los plásmidos pCIP101, pCIP111, pCIP113, pCIP130, pCIP205, pCIP213 y pCIP217, los cuales permiten la hiperproducción de las proteínas mutantes Asp-9→Glu (D9E), Asp-9→Lys (D9K), Asp-9→Asn (D9N), Asp-9→His (D9H), Glu-36→Asp (E36D), Glu-36→Gln (E36Q) y Glu-36→Lys (E36K), respectivamente. Las mutaciones Asp-9→Gln, Glu-36→Asn y Glu-36→His no pudieron obtenerse a pesar de la secuenciación de una gran cantidad de clones.

5.1.2. Actividad enzimática de los mutantes

El sistema de expresión del vector pINIII-(*lpp*-5)-A3 posibilita, como se ha visto en el apartado 2.1, la producción de grandes cantidades de lisozima CPL I. Todas las proteínas mutantes pudieron obtenerse con similares rendimientos a la enzima nativa a partir de extractos de cultivos de *E. coli* DH1 inducidos con lactosa. Asimismo, todas ellas pudieron purificarse en un sólo paso utilizando cromatografía en DEAE-celulosa (apartado 1.2.).

La actividad de las enzimas se determinó sobre paredes de neumococo marcadas con [³H-metil]-colina. Dada la distinta eficiencia catalítica de las diversas proteínas se fijó el tiempo de

reacción en 30 minutos y el pH en 5.0 y se varió la cantidad de enzima ensayada de modo que se obtuviera, aproximadamente, la misma cantidad de radiactividad liberada en el ensayo. Las enzimas menos activas se ensayaron a pH 6.0 ya que se precisaban en estos casos grandes cantidades de proteína, la cual precipita a pHs más bajos. Por otro lado, la gran heterogeneidad existente entre las diversas preparaciones de paredes de neumococo hace que el cálculo de parámetros como la constante de Michaelis carezca de sentido, puesto que su valor variaba de una preparación a otra.

Los resultados obtenidos de la actividad enzimática de las distintas proteínas se muestran en la tabla 12. Sólo en el caso del mutante E36K no se detectó actividad. Los mutantes D9K y D9H mostraron una actividad muy baja, aunque detectable. Las enzimas D9E y D9N conservan una actividad de aproximadamente el 2% con respecto a la enzima salvaje. Sorprendentemente, las enzimas mutantes E36D y E36Q mostraron una actividad del 37 y 67%, respectivamente, actividad anormalmente alta si, como se suponía, el residuo de glutámico está implicado en la catálisis.

5.1.3 Introducción de un aminoácido apolar

Los resultados presentados en el anterior apartado fueron obtenidos al sustituir los residuos Asp-9 y Glu-36 por aminoácidos polares, algunos de ellos cargados. Para comprobar el comportamiento de un aminoácido apolar en estas posiciones nos propusimos la sustitución de los aminoácidos Asp-9 y Glu-36 por un aminoácido apolar cuya inserción no supusiera, en principio, un desajuste grande en la estructura terciaria de la proteína en esta zona. El aminoácido que se eligió para este experimento fue la alanina. Al mismo tiempo, se pensó en la construcción de un doble mutante [Ala-9, Ala-36] en el cual se habría eliminado por completo la posible implicación de los dos residuos ácidos en el mecanismo.

Los oligonucleótidos diseñados para la obtención de los mutantes Asp-9→Ala (D9A), Glu-36→Ala (E36A) y el doble mutante (D9A, E36A) se muestran en la tabla 11. En el experimento de mutagénesis dirigida se hibridó el DNA de cadena simple de M13 que contenía el inserto XbaI-SphI con los dos oligonucleótidos al mismo tiempo, lo que permitió el aislamiento simultáneo de

TABLA 12. Actividad enzimática *in vitro* de las proteínas mutadas en los aminoácidos 9 y 36 de la lisozima CPL¹

Mutante	Aminoácido		cpm ¹	Enzima (ng)	Actividad (%) ²
	9	36			
Nativo	Asp	Glu	751	0,5	100
101(D9E)	Glu	Glu	1266	50	1,7
111(D9K)	Lys	Glu	ND ³	-	<0,00001
113(D9N)	Asn	Glu	921	27	2,2
130(D9H)	His	Glu	3180	5400	0,0008 ⁴
314(D9A)	Ala	Glu	1051	570	0,1
205(E36D)	Asp	Asp	275	0,5	37
213(E36Q)	Asp	Gln	440	0,45	67
217(E36K)	Asp	Lys	3063	3600	0,0013 ⁴
304(E36A)	Asp	Ala	369	5	5,0
308 (D9A,E36A)	Ala	Ala	324	5000	0,00014 ⁴

¹ Radiactividad liberada en el ensayo. Las condiciones fueron: Tampón acetato 25 mM, pH 5,0, 30 minutos, 37°C

² Actividad con respecto a la proteína nativa.

³ N.D.: No se detectó actividad en ningún caso.

⁴ Ensayo realizado en tampón fosfato 20 mM, pH 6,0 durante 24 horas.

los tres tipos de mutantes en un solo experimento. Se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior para la obtención de las proteínas mutadas, que se purificaron del modo usual. Los resultados de la actividad enzimática se muestran en la tabla 12. El resultado más importante fue el hecho de que el mutante E36A poseía un 5% de actividad con respecto a la enzima nativa. Asimismo, el mutante D9A tiene un 0,1% de actividad. El doble mutante Ala-9, Ala-36 posee una actividad extremadamente baja aunque detectable.

5.2. Análisis estructural y funcional de las proteínas mutantes

La pérdida de actividad enzimática de las proteínas mutantes puede atribuirse a diversos factores, como pueden ser la variación de las condiciones óptimas del ensayo o la aparición de cambios conformacionales que dificulten el proceso catalítico. Para comprobar la primera hipótesis, se estudió la dependencia de la actividad con respecto al pH. Al realizar estos experimentos se pudo comprobar que, al igual que la enzima salvaje, todas las enzimas tenían el máximo de actividad a pH 5,0.

Para determinar en qué medida las mutaciones introducidas en la lisozima CPLI podrían haber originado un cambio conformacional en la proteína que fuera responsable de la pérdida de actividad enzimática se realizaron espectros de dicroísmo circular de todas las proteínas mutantes. Tan sólo las enzimas D9K y E36K parecen tener una estructura algo diferente a la proteína nativa (figura 38), mientras que el resto de las proteínas mutantes no presentaba variaciones significativas.

5.3. Actividad de las proteínas mutantes *in vivo*

Aunque los ensayos *in vitro* demostraban que la mayoría de las proteínas mutantes conservaban cierto grado de actividad sobre paredes aisladas de neumococo, una prueba concluyente sobre la actividad real de estas proteínas sería su ensayo *in vivo*. Los experimentos de este tipo que se realizan en el sistema de *S. pneumoniae* se denominan "curación fenotípica" (Tomasz y Waks, 1975), y consisten en la adición exógena de enzima lítica a cultivos de cepas de neumococo con el fenotipo Lys⁻, es decir, incapaces de autolizarse al final de la fase exponencial

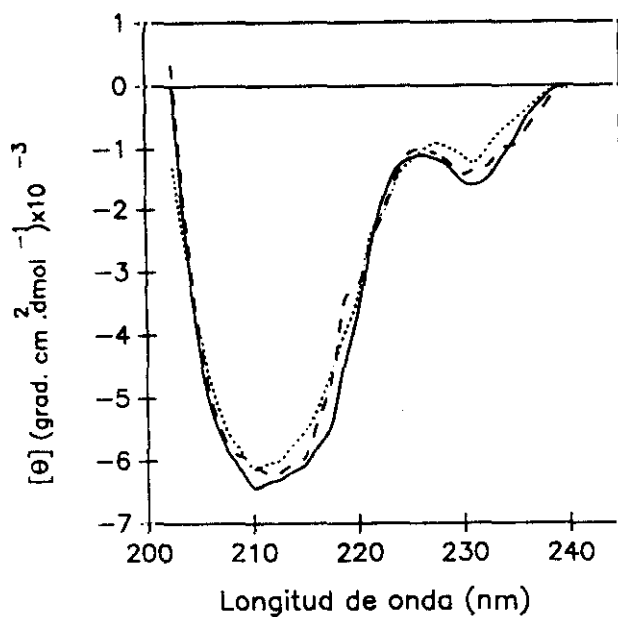


FIGURA 38. Espectros de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano de la proteína CPLI nativa (—), el mutante D9K (----) y el mutante E36K (.....).

de crecimiento, y posteriormente determinar la posible autólisis provocada por la adición de enzima. En la figura 39 se muestra el experimento de curación de la cepa M31 de neumococo por la enzima nativa y los mutantes E36Q y E36D (los más activos *in vitro*). La cantidad de enzima necesaria para provocar la autólisis fue mucho mayor en el caso de las proteínas mutantes que en el de la proteína nativa. Se puede concluir de estos experimentos que los mutantes E36Q y E36D mantienen un 13% y un 5%, respectivamente, de capacidad curativa con respecto a la lisozima nativa. Con este experimento se demostró que, aunque con una eficiencia mucho más baja, estos mutantes poseen actividad *in vivo* sobre neumococo.

5.4. Requerimiento del componente peptídico del peptidoglicano para la actividad lítica de la lisozima CPLI

Con objeto de determinar la importancia de la presencia de los péptidos que componen el peptidoglicano de neumococo para la actividad enzimática de la lisozima CPLI, se procedió en primer lugar a la digestión de paredes de *S. pneumoniae* marcadas con colina radiactiva con la amidasa LYTA, con lo que se separa el componente peptídico del componente glicánico (figura 3B). Los productos de degradación se cromatografiaron en una columna de Sephadex G-75 como describen García y cols. (1987) y se recuperó la fracción radiactiva que aparecía en el volumen de exclusión (figura 40) correspondiente a la cadena glicánica sin el péptido. La posterior digestión de esta fracción con lisozima CPLI no produjo cambios significativos en el patrón de elución en Sephadex G-75 (figura 40). Como la amidasa LYTA, después de la primera digestión, podría encontrarse todavía unida a los residuos de colina de los ácidos teicoicos de la pared, dificultando de este modo la interacción de la lisozima con el aminoalcohol, el producto de la digestión con la amidasa se trató con colina libre o bien se sometió a una desnaturalización térmica (75°C) con objeto de disociar la posible enzima unida a la cadena glicánica. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos permitió la digestión por la lisozima CPLI, por lo que habría que concluir que la presencia del péptido es necesaria para que la lisozima pueda llevar a cabo su acción hidrolítica.

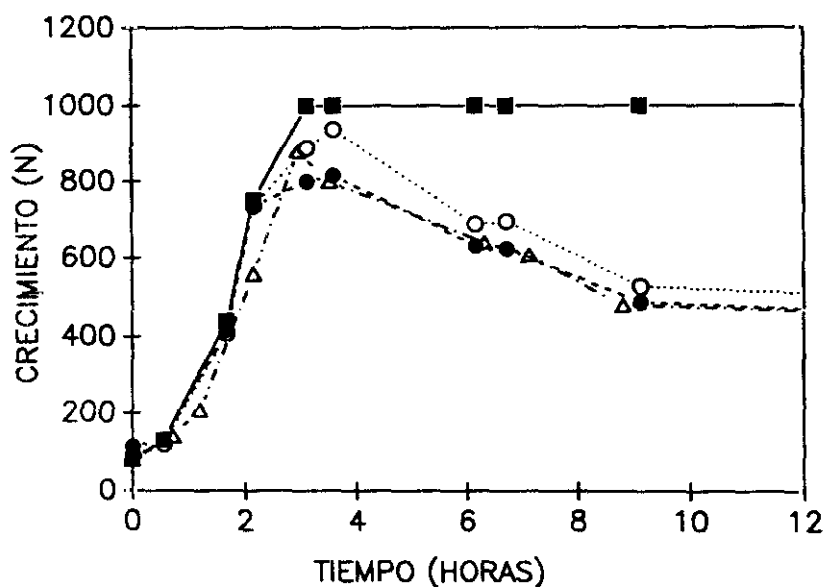


FIGURA 39. Experimento de curación fenotípica de neumococo con lisozimas CPL I mutantes. La cepa M31 de neumococo se cultivó a 37°C y se registró la nefelometría del cultivo: (■—■), control de M31 sin adición exógena de enzima lítica; (○···○), adición de CPL I nativa a una concentración final de 39 ng/ml (25 unidades/ml); (●-·-·●), adición del mutante E36Q (300 ng/ml, 75 unidades/ml); (Δ-·-·Δ), adición del mutante E36D (800 ng/ml, 200 unidades/ml). Todas las enzimas se añadieron al cultivo a los 40 minutos.

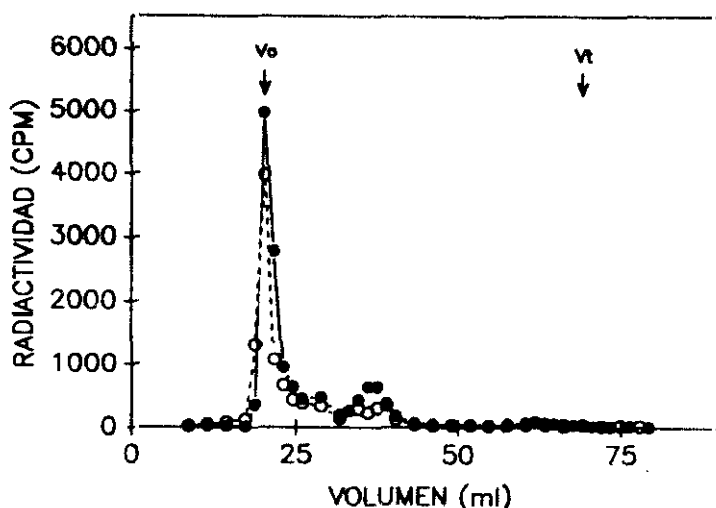


FIGURA 40. Degradación secuencial de la pared de neumococo por la amilasa LYTA y la lisozima CPLI.

Paredes aisladas de neumococo marcadas con colina radiactiva fueron digeridas totalmente con amilasa LYTA como se describe en el apartado 8.1.3. de Materiales y Métodos. Tras detener la reacción, los productos de la digestión fueron posteriormente cromatografiados en una columna de Sephadex G-75 (●—●), recogiendo fracciones de 1,44 ml y contando la radiactividad de 0,4 ml de cada fracción. Las fracciones recogidas entre los 19-25 ml de eluido (correspondientes al volumen de exclusión) se dializaron y liofilizaron, volviéndose a disolver en 300 μ l de tampón SPSH más 200 μ l de tampón fosfato 20 mM pH 6,0 y añadiendo una cantidad en exceso de lisozima CPLI. La digestión se llevó a cabo durante 16 horas y se procesó como se ha descrito anteriormente (○—○). V_o , volumen de exclusión; V_t , volumen total.

6. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS DOMINIOS C-TERMINALES DE LAS PEPTIDOGLICAN-HIDROLASAS DE *S. PNEUMONIAE*

6.1. Fusiones del dominio C-terminal de la lisozima CPL1 con la β -galactosidasa

La importancia de la β -galactosidasa en distintos procesos industriales, y su empleo en técnicas de ingeniería genética como marcador genético (Young y Davis, 1983) o como elemento estabilizador en fusiones con otras proteínas (Itakura y cols., 1977; Goeddel y cols., 1979) ha significado el desarrollo de vectores que contienen el gen *lacZ* en una variedad de construcciones que facilitan la obtención de proteínas híbridas con la β -galactosidasa (Casadaban y cols., 1983). Debido a la importancia de esta proteína y a la facilidad de manipulación genética del gen *lacZ*, se eligió este sistema para comprobar si las proteínas híbridas que contienen el dominio de reconocimiento de colina pudieran ser purificables en un solo paso en columnas de DEAE-celulosa (apartado 1.2.).

6.1.1. Obtención de la proteína híbrida C-CPL1- β -galactosidasa con el dominio de reconocimiento de colina como región N-terminal

Uno de los vectores desarrollados para producir fusiones con la β -galactosidasa, el plásmido pMC1871, contiene el gen *lacZ* excepto los nucleótidos que codifican para los primeros 7 aminoácidos de la proteína (que no son esenciales para su actividad: Casadaban, 1983). El gen *lacZ* se encuentra precedido en este plásmido de una secuencia de clonación múltiple (figura 41) y carece de promotor, por lo que sólo las colonias que lleven el plásmido que contenga una fusión con un promotor adecuado tendrían color azul cuando se cultivaran en placas conteniendo X-GAL. La construcción del plásmido pCM16, que contiene una fusión del dominio de unión a colina de la lisozima CPL1 (C-CPL1) con la β -galactosidasa se llevó a cabo como se muestra en la figura 41. El plásmido pCM1, que codifica para el dominio C-CPL1 (apartado 3.1.1.) (Sánchez-Puelles y cols., 1990), se digirió con *Bsp*HI y sus extremos se hicieron romos con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. De este modo se obtiene la secuencia del gen que codifica para el dominio C-CPL1 junto con los promotores *lpp-lac* (Inouye y Inouye, 1985). Por otro lado, el plásmido pMC1871 se digirió con *Sma*I, en donde se insertó el fragmento *Bsp*HI del

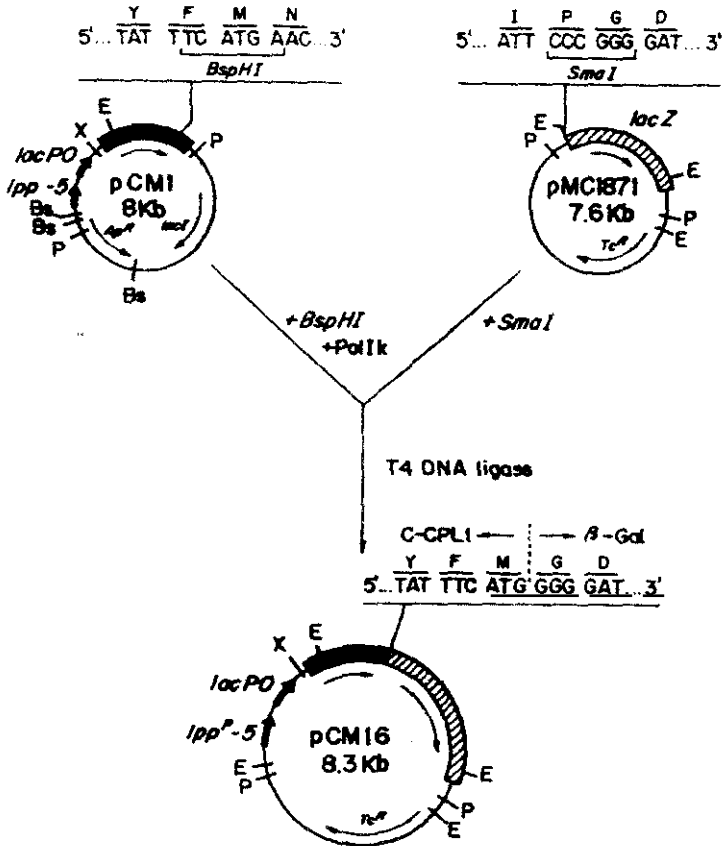


FIGURA 41. Construcción del plásmido pCM16.

Enzimas de restricción mostradas: Bs, BspHI; E, EcoRI; P, PstI; X, XbaI. Se muestran las secuencias de nucleótidos y las correspondientes secuencias de aminoácidos de las regiones de interés. En trazo grueso se representa el gen *c-cplI* y en trazo rayado el gen *lacZ*.

plásmido pCM1, creándose de este modo una fusión en fase con el gen *lacZ*. Así, la región N-terminal de la proteína híbrida correspondería al dominio de unión a colina C-CPLI, mientras que la región C-terminal la constituiría la β -galactosidasa. La mezcla de ligación se usó para transformar células competentes de *E. coli* TGI. Las colonias con el plásmido recombinante pCM16 mostraron color azul cuando fueron incubadas en placas con X-GAL. La precisión de la construcción se puso de manifiesto mediante análisis de restricción.

Uno de los clones recombinantes *E. coli* TGI [pCM16] se cultivó a 37°C hasta que la densidad óptica del cultivo medida a 550 nm llegó a 0,2. El inductor IPTG se añadió entonces en una concentración de 1 mM y se prosiguió la incubación durante 16 horas. Los extractos bacterianos fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (figura 42), observándose la hiperproducción de una doble banda de $M_r = 120.000$. Estos extractos se purificaron en DEAE-celulosa mediante elución específica de la proteína con un tampón conteniendo colina al 2%, igual que se había descrito previamente para la purificación de las enzimas líticas dependientes de colina y sus dominios C-terminales (apartado 2.1.2). Se observó que, de igual manera que la proteína C-CPLI, la proteína de fusión C-CPLI- β -galactosidasa precipitó tras la diálisis llevada a cabo para eliminar el NaCl y la colina del tampón de elución, si bien pudo redisolverse en un tampón conteniendo colina 70 mM. La proteína purificada se obtuvo con un rendimiento de 25 mg/litro de cultivo, y poseía una actividad de β -galactosidasa en un orden de magnitud comparable a la descrita para la β -galactosidasa nativa (aproximadamente 300.000 unidades/miligramo de proteína) (Miller, 1972).

6.1.2. Inmovilización de la proteína híbrida en columna

Para comprobar si la proteína híbrida podía ser inmovilizada en DEAE-celulosa sin perder actividad, se cargó en columna un extracto de *E. coli* TGI [pCM16] cultivado en las mismas condiciones que en el apartado anterior. Después de lavar exhaustivamente la columna con 1,5 M de NaCl, se ensayó la actividad β -galactosidasa retenida en la columna, y por último se eluyó la proteína de fusión con colina. Aproximadamente $5,5 \times 10^{-5}$ mg de proteína pudieron inmovilizarse por miligramo de DEAE-celulosa, si bien las condiciones de inmovilización son susceptibles de ser mejoradas con toda seguridad. Dado que se pudieron valorar 11,5

RESULTADOS

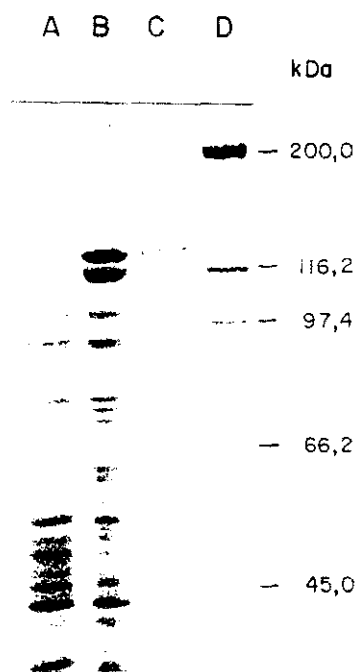


FIGURA 42. Producción de la enzima híbrida C-CPLI- β -galactosidasa.

Calle A, extracto de *E. coli* TGI [pCM16] cultivado en ausencia de IPTG; calle B, extracto de un cultivo inducido con IPTG 1 mM; calle C, proteína híbrida C-CPLI- β -galactosidasa purificada por DEAE-celulosa; calle D, marcadores de peso molecular. El gel de electroforesis era del 7%.

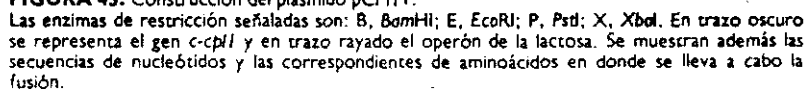
unidades/miligramo de DEAE-celulosa, esto implicaba que la enzima inmovilizada retenía un 65% de actividad con respecto a la proteína pura.

6.1.3. Construcción de la proteína híbrida β -galactosidasa-C-CPLI (C-CPLI como región C-terminal)

En la construcción del plásmido pCM16 hay que señalar que el dominio C-CPLI conserva sus propiedades funcionales de afinidad por colina y sus análogos aunque se encuentra en la región N-terminal de la proteína quimérica. Como resultaba interesante comprobar el papel del dominio C-CPLI en la posición C-terminal de una proteína de fusión, se procedió a la construcción del plásmido pCM11, que permitiría la producción de una proteína híbrida β -galactosidasa-C-CPLI, que posee los elementos funcionales invertidos en su posición con respecto a la construcción anterior.

El plásmido pCM1 fue cortado en el sitio único EcoRI que se encuentra en el inicio del gen que codifica para el dominio C-CPLI (figura 43), haciendo romos los extremos cohesivos resultantes. Asimismo, el plásmido pMC931 (Casadaban y cols., 1983) fue cortado con las enzimas BamHI y EcoRI, haciendo también romos sus extremos. De este modo se obtuvo el gen *lacZ*. Puesto que se ha descrito previamente que las inserciones en el sitio EcoRI del gen *lacZ* generan una proteína inactiva (Young y Davis, 1983), era de esperar que la proteína de fusión también lo fuera. Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de la cepa JM83 de *E. coli*. Las colonias con el plásmido recombinante pCM11 presentaban color azul en placas con X-GAL debido a un proceso de α -complementación con la β -galactosidasa delecionada de la propia cepa. Cuando se transformó la cepa MC1116 con el plásmido pCM11 todas las colonias con el plásmido eran blancas, puesto que esta cepa posee una deleción total del gen *lacZ* y no existe, por tanto, posibilidad de α -complementación.

El cultivo de la cepa recombinante y la inducción de la expresión del gen de la fusión fueron exactamente las mismas que las que se utilizaron con la proteína de fusión C-CPLI- β -galactosidasa (apartado 6.1). Cuando los extractos de *E. coli* JM83 con el plásmido pCM11 se analizan en SDS-PAGE (figura 44), se observa una apreciable producción de proteína híbrida. Sin



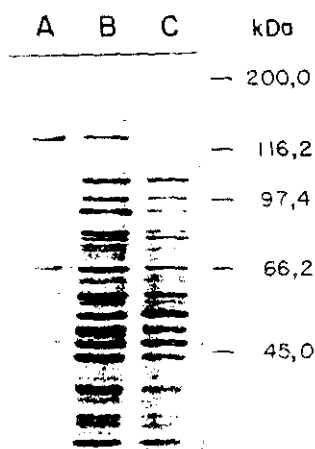


FIGURA 44. Producción de la enzima híbrida β -galactosidasa-C-PLI.

Calle A, eluido con SDS al 2% de la columna de DEAE-celulosa donde previamente se había aplicado un extracto de *E. coli* JM83 [pCM11]; calle B, extracto de la misma cepa cultivada en presencia de lactosa 2%; calle C, extracto de la misma cepa cultivada en ausencia de inductor.

embargo, cuando se intentó purificar la proteína de fusión en DEAE-celulosa, se pudo comprobar que se retenía en la columna de tal modo que no podía ser eluida ni siquiera con altas concentraciones de colina. Tan sólo se pudo eluir de la columna con SDS. Las razones de este hecho son desconocidas, aunque una posible explicación es que esta proteína en concreto adquiriera, cuando está unida a la resina, una conformación tal que impida el acceso de las moléculas de colina al dominio de unión a colina y por tanto la competición con los residuos de DEAE.

6.2. Construcción de una proteína de fusión C-LYTA-TcRB8.1

La cadena β de la línea Jurkatt del receptor de células T (Wilson y cols., 1988) consta de una región variable, otra constante y dos zonas que las separan (D y J). Con objeto de obtener anticuerpos que reconociesen las zonas variable, D y J del receptor (proteína TcRB8.1) se ideó la construcción de una fusión entre esta proteína y el dominio C-terminal de la autolisina LYTA de *S. pneumoniae* (C-LYTA). La proteína C-LYTA posee características estructurales y funcionales similares a las de la proteína C-CPLI, lo que le convierte en otro candidato válido a la hora de construir proteínas híbridas purificables por DEAE-celulosa. La especial distribución de sitios de restricción del plásmido pCE17 (Sánchez-Puelles y cols., 1990) le hacía especialmente atractivo para construir la proteína de fusión C-LYTA-TcRB8.1. Este plásmido expresa el gen *c-lytA* bajo el control de los promotores *lpp-lac* (Inouye e Inouye, 1985).

A partir de una genoteca de cDNA de linfocitos T humanos se obtuvo el plásmido pTcRB8S (figura 45) (Santiago Rodríguez, comunicación personal). Este plásmido contiene el gen que codifica para la proteína TcRB8.1 con la secuencia del péptido señal de 19 aminoácidos. El plásmido se digirió con *NcoI* y *HindIII*, las mismas enzimas con las que se digirió el plásmido pCE17 (figura 45). Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* DH1, y se seleccionaron por análisis de restricción las colonias que poseían el plásmido recombinante pCE3910. Los clones positivos producían una proteína de fusión ($M_r = 43.000$) como se pudo comprobar mediante el procedimiento de "Western-blot" por hibridación con anticuerpos anti-C-LYTA (datos no mostrados). A pesar de contar con los promotores *lpp-5* y *lacPO* e inducir la expresión con lactosa ninguna de las colonias analizadas hiperexpresaba el gen de fusión.

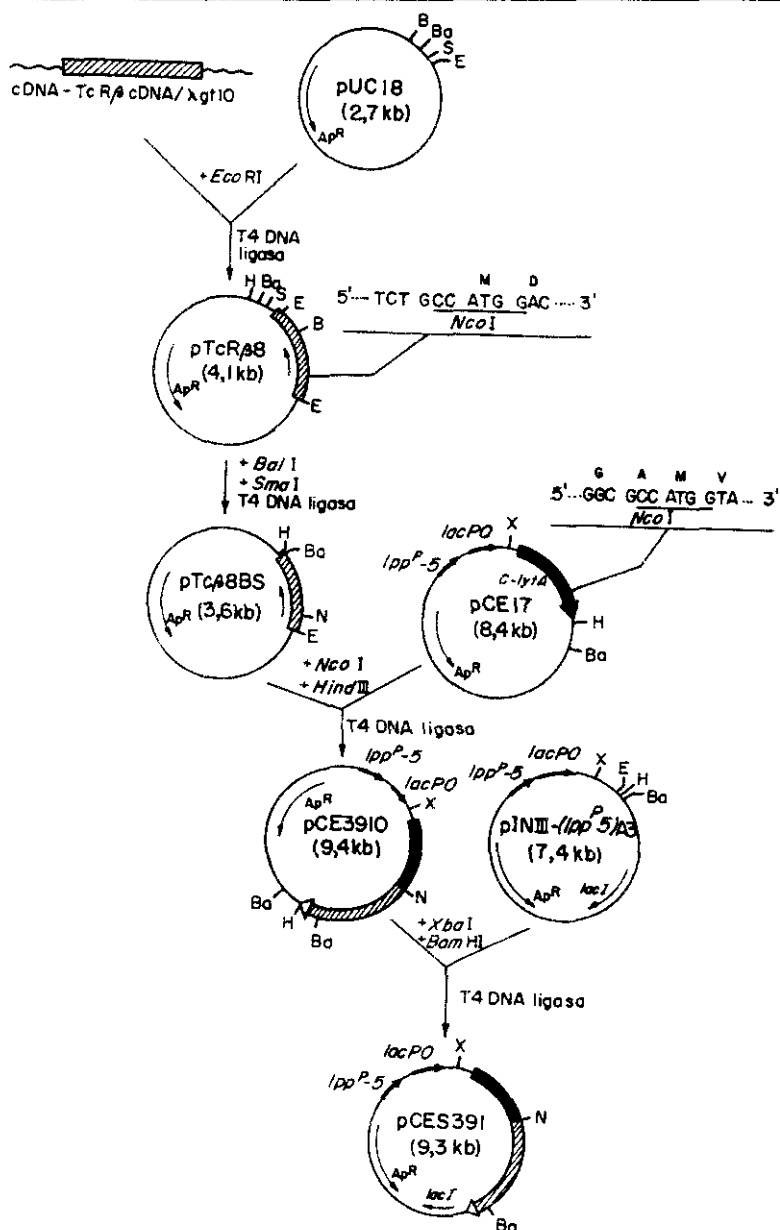


FIGURA 45. Construcción del plásmido pCES391.

Las enzimas de restricción señaladas son las siguientes: B, BglI; Ba, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; N, NcoI; S, SmaI; X, XbaI. Se muestran las secuencias de nucleótidos y las correspondientes de aminoácidos en las regiones de fusión.

Suponiendo que la posible toxicidad de la proteína quimérica hubiera inducido la selección de los clones menos productores, se procedió a la subclonación del fragmento *XbaI-BamHI* del plásmido pCE3910 en el mismo lugar del plásmido pINIII-(*hspP-5*)-A₃ (Inouye e Inouye, 1985), construyéndose de este modo el plásmido pCES391 (figura 45) y transformando células competentes DH1. En este nuevo intento se obtuvieron recombinantes hiperproductores por inducción del cultivo con lactosa, aunque sólo en un 25% de los recombinantes analizados (figura 46), lo que parece indicar que su toxicidad selecciona los clones no productores.

6.2.1. Purificación de la proteína híbrida C-LYTA-TcR88.1

Cuando los extractos de cultivos de *E. coli* DH1 [pCES391] inducidos con lactosa se centrifugaron con el objeto de eliminar los restos celulares del proceso de sonificado o en el tratamiento con French-press, se observó que en el precipitado permanecía la mayor parte de la proteína de fusión. La proteína podía precipitarse con el mismo rendimiento por centrifugación del extracto a baja velocidad (100xg), y sólo podía disolverse por medio de agentes desnaturizantes como el SDS o el cloruro de guanidinio. Todos estos datos nos llevaron a pensar que la proteína quimérica formaba cuerpos de inclusión, extensamente descritos en la literatura (Marston, 1986). Para confirmar esta hipótesis, se procedió al análisis al microscopio electrónico de las células productoras de la proteína. Como se puede apreciar en las fotografías (figura 47), se forman cuerpos refringentes que inicialmente se ubican por toda la célula pero que finalmente se acumulan en uno de los polos de ésta.

El tratamiento de los cuerpos de inclusión para solubilizar y recuperar en forma nativa la proteína de interés se hace habitualmente con agentes desnaturizantes seguido de un procedimiento de renaturalización. Sin embargo, los métodos de solubilización utilizados como el tratamiento con sosa, urea, cloruro de guanidinio y detergentes (Tritón X-100, DOC) no produjeron resultados satisfactorios. La incubación del cultivo bacteriano a temperaturas de 30°C o menores, así como la eliminación del inductor en el cultivo evitó la formación de cuerpos de inclusión, pero la producción de proteína era muy escasa. Por todo ello, se abandonó la idea de purificación en la resina de DEAE-celulosa y se procedió a la electroelución de la proteína de geles de poliacrilamida-SDS. Como lo que se pretendía era la obtención de anticuerpos que

RESULTADOS

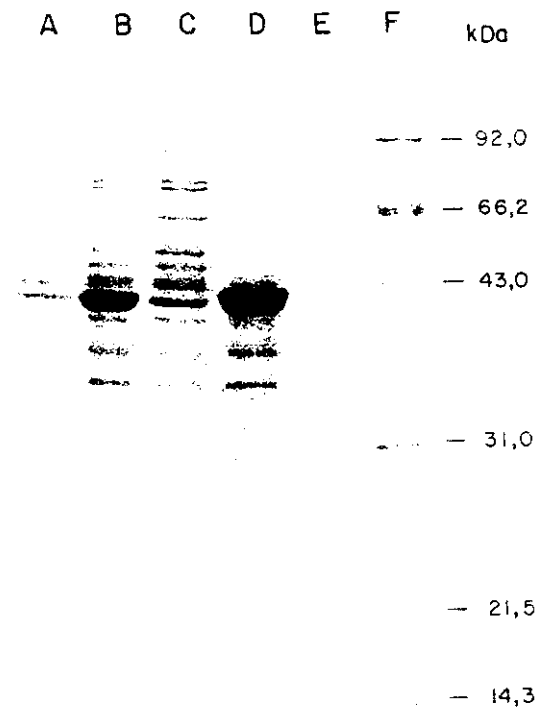


FIGURA 46. Producción de la proteína híbrida C-LYTA-TcR88.1.

Calle A, extracto de *E. coli* DH1 [pCES391] cultivado en ausencia de lactosa; calle B, extracto de la misma cepa cultivada en presencia de lactosa 2%; calle C, sobrenadante procedente de la centrifugación del extracto a 100 x g; calle D, precipitado de la sedimentación anterior disuelto en SDS 2%; calle E, proteína C-LYTA-TcR88.1 purificada por electroelución de geles de poliacrilamida-SDS; calle F, marcadores de peso molecular. El gel de electroforesis era del 12,5%.

RESULTADOS

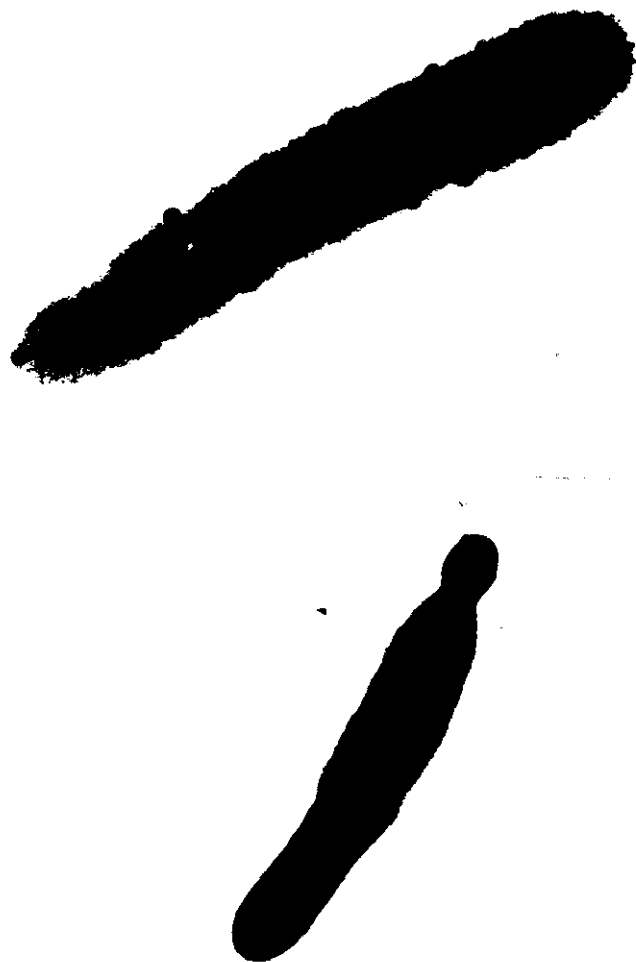


FIGURA 47. Acumulación de la proteína híbrida C-LYTA-TcR88.1 en *E. coli*. En la fotografía se muestran células de *E. coli* DH1 [pCES391] cultivadas en presencia de lactosa 2% y recogidas al final de la fase exponencial de crecimiento. No se procedió a corte ni tinción alguno.

reaccionaran con la proteína TcR β 8.1, carecía de importancia el que se obtuviera la proteína en forma desnaturalizada. Tras la recuperación de la proteína mediante electroelución de geles de poliacrilamida-SDS (figura 46) se obtuvieron anticuerpos que reaccionaban con ella, iniciándose una serie de estudios que todavía se están llevando a cabo.

IV DISCUSSION

I. UN NUEVO METODO DE PURIFICACION DE LAS PEPTIDOGLICAN-HIDROLASAS DE NEUMOCOCO DEPENDIENTES DE COLINA

El requerimiento que muestra la mayoría de las peptidoglicán-hidrolasas de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos por la presencia de colina en la pared celular de neumococo para poder llevar a cabo su actividad constituyó la base del sistema de purificación ideado por Briese y Hackenbeck (1985) en soportes de Sepharosa-colina. Aunque el método permitía la purificación de estas proteínas a homogeneidad electroforética en un solo paso, el sistema no estaba exento de inconvenientes, como lo es su alto coste. Por lo tanto, uno de los primeros objetivos de esta Tesis fue la búsqueda de un nuevo sistema de purificación de la lisozima CPL1, y por extensión, de todas las peptidoglicán-hidrolasas de neumococo dependientes de colina que mantuviera las ventajas del empleo de la Sepharosa-colina pero que no tuviera los inconvenientes citados.

Dado que una de las posibles alternativas era la búsqueda de soportes cromatográficos que contuvieran análogos de colina, se procedió al análisis de la interacción de estas mureín hidrolasas con distintos análogos de colina. Los experimentos de conversión de la amidasa LYTA constituyen un sistema rápido y eficaz de comprobación del grado de interacción de diversos compuestos análogos de la colina con esta proteína. Los resultados que se muestran en la tabla 2 indican que existe un gran número de compuestos capaces de producir la conversión de la amidasa a una concentración de 0,1 M. La proteína es capaz de tolerar la unión de análogos con distintos sustituyentes del átomo de nitrógeno y del grupo OH, algunos muy voluminosos como los grupos bencilo y benzoilo (compuestos E y F) aunque la existencia de grupos polares como sustituyentes del nitrógeno parece interferir en el proceso de conversión (compuesto J). El único requerimiento estructural que parece existir es la presencia de al menos tres sustituyentes en el átomo de nitrógeno, es decir, la estructura mínima necesaria para inducir la conversión es la de una amina terciaria alifática. El compuesto límite que cumple esta condición es la *N,N,N*-trimetilamina, la cual es capaz de inducir la conversión de la amidasa aunque a concentraciones superiores a las habituales (0,5 M). Las aminas secundarias y primarias, como la etanolamina, no son capaces de interaccionar específicamente con la amidasa LYTA, lo que está de acuerdo con el hecho de que, cuando la colina de la pared

celular de neumococo se sustituye por etanolamina o *N*-metiletanolamina, la amidasa LYTA es incapaz de degradar el nuevo sustrato (Tomasz, 1968). Estos resultados sugieren que en el centro o centros de unión de colina de la amidasa, además de una carga negativa que interaccione con la carga positiva del átomo de nitrógeno del ligando, debe de existir un entorno hidrofóbico que interaccione con los tres grupos metilo de la molécula de colina y que a su vez sea lo suficientemente flexible como para poder acomodar otros grupos más voluminosos. Por otra parte, los sustituyentes del grupo OH de la molécula, o el propio grupo hidroxilo no parecen ser relevantes en el proceso de interacción, lo cual parece lógico si se tiene en cuenta que el sustituyente de este grupo funcional en la pared celular de neumococo es el voluminoso polímero de ribitol fosfato que constituye el ácido teicoico (figura 3).

Uno de los análogos de colina que pueden convertir la amidasa LYTA es la *N,N*-dietiletanolamina (DEAE), componente de las resinas de DEAE-celulosa. La especificidad de la interacción se demostró no sólo con el experimento de conversión sino con la observación de que la DEAE es capaz de actuar sobre la autolisina LYTA cuando se añade de forma exógena a los cultivos de *S. pneumoniae* provocando, al igual que la colina, la inhibición de la amidasa LYTA e induciendo por tanto los mismos cambios en la morfología de esta bacteria (figura 7). Todos estos datos sugerían que la resina de DEAE-celulosa podía ser un candidato idóneo como soporte de afinidad para la purificación de la amidasa LYTA. En la figura 8 se puede comprobar cómo la cromatografía en DEAE-celulosa posibilita la purificación de la amidasa LYTA a homogeneidad electroforética en un solo paso. La proteína LYTA procedente del extracto celular quedó adsorbida tan fuertemente a la resina que ni siquiera un lavado con 1,5 M de NaCl fue capaz de desprenderla de la resina. Sin embargo, el lavado con una concentración relativamente baja de colina (0,15 M) permitió la recuperación de toda la proteína LYTA, lo que constituye una medida de la especificidad de la interacción de la amidasa con el DEAE. Dada la similitud existente entre los dominios C-terminales de la amidasa LYTA y de la lisozima CPLI, supuestamente implicados en el proceso de reconocimiento de la colina de la pared celular, se procedió a la purificación de esta última enzima por el mismo procedimiento, obteniéndose el resultado que se muestra en la figura 9. La glucosaminidasa de neumococo, la enzima lítica codificada por el bacteriófago HB-3 de neumococo (Romero y cols., 1990a) y otras proteínas que se estudian en esta Tesis han sido también purificadas por

este método con los mismos resultados. Las resinas que contienen DEAE poseen un gran número de ventajas sobre la Sepharosa-colina: están disponibles comercialmente, no necesitan preparación previa, son fácilmente regenerables y existen en una gran variedad de soportes además de la celulosa, como el dextrano (DEAE-Sephadex) o la acrilamida (DEAE-Biogel).

2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA LISOZIMA CPLI Y DE SU INTERACCION CON COLINA

Para obtener grandes cantidades de lisozima CPLI se necesitaba construir un sistema de expresión del gen *cplI* más eficaz. La construcción del plásmido pCIP100 (figura 10) permitió la obtención de la enzima con un rendimiento cercano a 35 mg de proteína por litro de cultivo (figura 9). En el plásmido pCIP100 el gen *cplI* se encuentra regulado por los promotores de la lipoproteína y del operón de la lactosa del vector pINIII-(lppP-5)-A3 (Inouye e Inouye, 1985). Esta combinación ya había demostrado ser muy efectiva en cuanto a la hiperexpresión de genes aunque la producción de lisozima CPLI parece ser excepcionalmente alta. Una posible explicación a este hecho puede provenir de la misma construcción del plásmido pCIP100, en donde se origina la formación de un marco de lectura abierto entre los promotores y el gen *cplI*. La existencia de estos pequeños marcos de lectura previos a la secuencia del gen de interés ya ha sido descrita en sistemas de alta expresión de genes (Schoner y cols., 1987).

Gracias a la obtención de una elevada cantidad de proteína se pudo proceder a su análisis por dicroísmo circular (CD). El análisis de los espectros de CD de la lisozima CPLI (figura 13) permite un cálculo de la estructura secundaria de la proteína, con un 19% de α -hélice, 35% de lámina β , 32% de giros β y 14% de estructura aperiódica, según los parámetros de Bolotina y cols. (1980). La peculiar forma del espectro en la región de 235-220 nm impide un ajuste preciso en esta zona (figura 13A). El mínimo que se encuentra centrado a 230 nm es una característica que se encuentra en dos serín-proteasas, la quimotripsina (Hunt y Jirgensons, 1973) y la elastasa (Gorbunoff y Timasheff, 1972). La aparición de esta banda ha sido explicada en base a la contribución, en el primer caso, de un triptófano, y en el segundo de una tirosina, en lugar de una contribución peptídica. Brahms y Brahms (1980) han analizado los espectros de varios dipéptidos que contienen un aminoácido aromático, determinando que la tirosina y el triptófano muestran una contribución positiva a 225 nm. Por lo tanto, la banda a 230 nm podría explicarse por la presencia de otra centrada a 225 nm debida a la contribución de los aminoácidos aromáticos de la proteína. Cuando la lisozima CPLI interacciona con colina, la banda a 225 nm aumenta de intensidad llegando incluso a mostrar valores de elipticidad positivos (figura 12). El cambio sufrido por esta banda es concomitante con el

aumento de intensidad observado en la banda centrada en los 295 nm del espectro registrado en la región del ultravioleta cercano (figura 12) donde sólo pueden medirse las contribuciones de triptófanos o de residuos ionizados de tirosina. La presencia de una banda positiva centrada a 225 nm es una característica inusual observada en algunas proteínas como la fibronectina (Khan y cols., 1988), la globulina insoluble en frío (Alexander y cols., 1979) y la DNasa ácida (Timasheff y Bernardi, 1970), donde este hecho también se ha explicado de acuerdo con la contribución de aminoácidos aromáticos al espectro. De todos modos, el espectro de CD registrado en presencia de colina puede explicarse en términos de composición de estructura secundaria sin tener en cuenta la interferencia de aminoácidos aromáticos, aunque para ello habría que admitir que un 43% de la estructura secundaria de la proteína la constituyen giros β (figura 13B).

La hipótesis de la existencia de residuos aromáticos en el sitio o sitios de reconocimiento de colina en la lisozima CPLI se sustenta en otras observaciones. En primer lugar, 12 de los 15 triptófanos de la molécula se encuentran en la región C-terminal de la proteína, dominio que se supone implicado en el reconocimiento del ligando (García y cols., 1988). La mitad de ellos forman parte del núcleo central aromático que se encuentra en los seis motivos repetidos que componen esta región (García y cols., 1988). Además, la importancia de la componente hidrofóbica descrita para la interacción entre la amidasa LYTA y la colina (apartado anterior) parece mantenerse en el caso de la lisozima CPLI puesto que un compuesto como la *N*-bencil-*N,N*-dimetiletanolamina es capaz de inducir los mismos cambios en el espectro de dicroísmo circular que la colina mientras que la adición de etanolamina no produce ningún efecto apreciable en la conformación de la proteína, dato que está de acuerdo con el hecho de que la lisozima CPLI es incapaz de degradar eficazmente paredes que contengan este aminoalcohol en lugar de colina (García y cols., 1987). Por otra parte, la emisión de fluorescencia de los residuos de triptófano (dejando aparte una posible contribución de residuos ionizados de tirosina, de la que no se disponen datos suficientes en la literatura) se ve afectada por la interacción con colina, la cual provoca un aumento en la fluorescencia (figura 16). Una explicación a este hecho puede residir en la posibilidad de que la fluorescencia de los residuos de triptófano se encuentre extinguida en cierto grado por la accesibilidad a las moléculas de disolvente o por la cercanía de grupos amino o carboxilo

protonados (Beechem y Brand, 1985). La unión de la colina provocaría un cambio conformacional que liberaría a los triptófanos de la proximidad del agente extintor. De todos modos la accesibilidad de los residuos de triptófano al exterior no debe de variar excesivamente tras la unión de la colina puesto que no hay cambios significativos en la longitud de onda del máximo de emisión, indicando que la polaridad del entorno de los triptófanos es muy similar en los dos casos. Además, la acción extintora de la acrilamida no se afecta apreciablemente (apartado 2.4.3.).

Los espectros de CD no sufren una variación significativa al incrementar la fuerza iónica hasta 1 M en NaCl (figura 12), ni en el intervalo de pH comprendido entre 6 y 10 (figura 14). Por tanto, el descenso en actividad lítica que presenta la lisozima CPLI cuando se ensaya en presencia de NaCl 500 mM o a pH 8,0 (figura 11) no debe atribuirse a la existencia de cambios conformacionales en la enzima en estas condiciones, sino más bien al efecto de estos agentes sobre el estado de ionización de ciertos residuos importantes para la catálisis o sobre la componente electrostática de la interacción con el sustrato. La fuerza iónica interfiere en la unión de colina a la lisozima CPLI, ya que los cambios conformacionales producidos por el ligando revierten, en parte, en presencia de 0,5 M de NaCl (figura 12), sugiriendo cierto grado de interacción electrostática entre la proteína y la carga positiva de la molécula de colina. La unión de la colina a la lisozima CPLI es completamente reversible, puesto que tanto los espectros de CD de la proteína purificada por DEAE-celulosa y dializada para la eliminación de la colina como los de la misma lisozima purificada por cromatografía de penetrabilidad, donde no se precisa la presencia de colina, resultaron ser idénticos.

Como se ha puesto de manifiesto a partir del análisis de los resultados obtenidos por la valoración calorimétrica de la lisozima CPLI con colina a 25°C (figura 18), la enzima posee un único tipo de sitios, con una entalpía de interacción $\Delta H_{298} = -160,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ y una constante de disociación de 2,4 mM. Este valor está de acuerdo con los datos obtenidos a partir del efecto de la concentración de colina sobre la actividad enzimática (figura 19), el espectro de dicroísmo circular (figura 19) y la fluorescencia de los residuos de triptófano (figura 20). En todos estos casos la mitad del cambio observado se produjo a una concentración de 2-3 mM. A pesar de tratarse de una alta constante de disociación, la lisozima CPLI mantiene una

extraordinaria afinidad por los residuos de dietilaminoetanol en las resinas de DEAE-celulosa. El hecho de que la concentración efectiva de DEAE en la columna llega a ser del orden de 150 mM, unido a la posible existencia de varios sitios de unión (apartado 4.4.4.) aseguraría la saturación de la proteína con ligando aunque el equilibrio de interacción no estuviera favorecido.

Los valores obtenidos para los parámetros termodinámicos asociados a la formación del complejo lisozima-colina muestran que el proceso de unión del ligando está desfavorecido entrópicamente, siendo la contribución de la entalpía el factor determinante del valor negativo de la energía libre.

La valoración de las cisteínas libres de la lisozima CPL1 sigue una cinética peculiar. Dos de las tres cisteínas de la molécula reaccionan con el DTNB en condiciones nativas mientras que la detección de la tercera sólo se consigue cuando se desnaturaliza la proteína. Al analizar el contenido en cisteínas libres del dominio C-terminal de la proteína (apartado 4.2. de Resultados) se observa que la valoración de su única cisteína se consigue únicamente desnaturalizando la proteína, lo que sugiere que esta cisteína (Cys-238) se encuentra oculta en el interior de la lisozima CPL1 y que moléculas como el DTNB sólo pueden acceder a ella cuando la proteína está desplegada.

En cuanto a la localización subcelular de la lisozima CPL1 en *E. coli*, los resultados de la tabla 4 parecen indicar que la proteína se ubica en la célula de un modo parecido al descrito para la amidasa LYTA (Díaz y cols., 1989), es decir, débilmente asociada a la cara periplásmica de la membrana celular de *E. coli*. Al igual que la amidasa, la lisozima CPL1 carece de una secuencia típica de un péptido señal N-terminal que pudiera dar cuenta del proceso de translocación a través de la membrana. Tampoco se observa ninguna secuencia señal interna como se ha descrito para la ovoalbúmina (Pugsley y Schwartz, 1985). Los mecanismos de secreción proteica en procariotas que no involucran un péptido señal requieren proteínas adicionales específicas para cada caso (Holland y cols., 1986; de Graaf y Oudega, 1986), por lo que es probable que éste no sea el caso de la lisozima CPL1 en *E. coli*. Se trataría por tanto de un caso peculiar de secreción sin péptido señal.

3. LA ESTRUCTURA MODULAR DE LAS LISOZIMAS CPL1 Y CPL7

La teoría modular de la evolución de las proteínas establece que, con respecto a algunos procesos evolutivos, ciertas proteínas se encontrarían estructuradas en unidades más pequeñas llamadas módulos que poseen una determinada funcionalidad que se mantiene con independencia del resto de la proteína en donde están incluidos, permitiendo de este modo a la proteína adaptarse a un nuevo entorno (Blake, 1978) adquiriendo una nueva funcionalidad mediante la captación o intercambio de las secuencias correspondientes a dichos módulos por recombinación genética (Gilbert, 1978). La especial distribución del genoma de los organismos eucarióticos podría facilitar el reordenamiento de secuencias de DNA posibilitando así la aparición de proteínas híbridas construidas en base al intercambio de estos módulos (Alberts y cols., 1983). El concepto de módulo varía según los autores: mientras que para Botstein (1980) un módulo es un conjunto de genes que cumplen una función biológica específica, para Doolittle (1985) los módulos son secuencias de un gen que codifican para un dominio proteico. Por último, también se ha propuesto que los pequeños péptidos de conformación definida son los módulos primordiales que constituyen las proteínas (DuBose y Hartl, 1989).

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las enzimas líticas LYTA, E|L, LYTA101, CPL1, CPL7 y CPL9, (García y cols., 1988, 1990; Díaz, 1991) había conducido a la hipótesis de que el sistema de las enzimas líticas de neumococo y sus bacteriófagos podría incluirse dentro de la teoría modular de evolución de las proteínas. Según esta hipótesis, estas enzimas estarían estructuradas en dos módulos o dominios: el N-terminal, donde se ubicaría el centro activo, y el C-terminal, responsable de la interacción con los residuos de colina del sustrato (apartado 2.4. de la Introducción). La construcción de enzimas quiméricas por intercambio de los dominios N y C-terminales (Díaz y cols., 1990, 1991) significó un gran avance en la confirmación de esta hipótesis.

Un primer dato que estaría de acuerdo con la estructuración modular de la lisozima CPL1 lo constituyó la clonación y expresión del dominio C-terminal de la lisozima CPL1 (proteína C-CPL1) (figura 21). El dominio C-CPL1 se purificó en un solo paso mediante cromatografía de afinidad en columnas de DEAE-celulosa (figura 22) al igual que la lisozima

CPLI completa, lo que indicaba que su capacidad para el reconocimiento de colina se mantenía intacta aun en ausencia del dominio N-terminal. Otros experimentos confirmaron la funcionalidad del dominio C-terminal de la lisozima CPLI en cuanto al reconocimiento de la colina. Por una parte, la colina induce específicamente cambios conformacionales en el espectro de CD de la proteína C-CPLI de la misma naturaleza que en la estructura de la lisozima (figura 23), de modo que, en los dos casos, se produce el incremento de intensidad de las bandas centradas a 295 y 225 nm. Por otro lado, la proteína C-CPLI puede reconocer la colina de los ácidos teicoicos de la pared de neumococo y de este modo bloquear la acción catalítica de las enzimas LYTA y CPLI (tabla 5) ya que dificulta la accesibilidad de estas proteínas al aminoalcohol. Un resultado similar se ha conseguido con el dominio C-terminal de la amidasa LYTA (Sánchez-Puelles y cols., 1990).

De igual modo que se hizo con el dominio C-terminal, se realizó el estudio estructural y funcional de la región N-terminal de la lisozima CPLI (proteína N-CPLI). Este dominio se expresó en *E. coli* como se describe en la figura 24. La proteína N-CPLI posee un cierto grado de actividad lítica de tipo lisozima sobre paredes de neumococo, aunque drásticamente disminuida con respecto a la lisozima entera (tabla 6). Sin embargo, la enzima N-CPLI degrada con la misma eficiencia paredes que contienen colina o etanolamina en su composición, lo cual es lógico si tenemos en cuenta que no está presente la región de la proteína capaz de reconocer el aminoalcohol de la pared. Por otro lado, los experimentos de proteólisis controlada de la lisozima CPLI con tripsina permitieron la obtención de la región N-terminal intacta de la enzima (proteína F1) (figura 26). La digestión triptica de la lisozima CPL7 origina asimismo la aparición de un fragmento resistente (F7) (figura 26) que también coincide con la región N-terminal de la proteína. Las proteínas F1 y F7 son también activas aunque en mucha menor medida que las lisozimas enteras (tabla 8). La conservación en estas proteínas de una especificidad enzimática muramidásica, como se pone de manifiesto en la figura 27A, concede una gran importancia a la actividad enzimática de los fragmentos a pesar de su baja eficiencia. De nuevo, la actividad mostrada era indiferente con respecto a la presencia de colina o etanolamina en los ácidos teicoicos de la pared. Todos estos resultados, junto con la producción por ingeniería genética de los dominios N-terminales de la amidasa LYTA (proteína N-LYTA) y de la lisozima CPL7 (N-CPL7) (Díaz, 1991) permiten afirmar con toda seguridad

que las regiones N-terminales de las enzimas líticas de neumococo y sus bacteriófagos son efectivamente las responsables de la actividad enzimática, y que pueden adquirir una conformación activa en ausencia de los dominios C-terminales respectivos.

Puesto que los dominios N y C-terminales conservan su funcionalidad en ausencia del otro dominio, cabe considerarlos como módulos, según la clasificación de Doolittle (1985). La baja actividad catalítica mostrada por los módulos N-terminales con respecto a las proteínas enteras permite suponer que dichos módulos pudieron ser en un tiempo enzimas funcionales a las que la adquisición del módulo C-terminal aportó un aumento considerable en la eficacia catalítica debido a que significó una mejora del sistema de reconocimiento del sustrato insoluble, añadiendo al mismo tiempo una mayor especificidad en este proceso.

La digestión de las lisozimas CPL1 y CPL7 por diferentes enzimas proteolíticas como la tripsina conduce en ciertos casos a la aparición de fragmentos resistentes (figuras 26 y 29) lo que constituye una prueba adicional en favor de la existencia de dominios en la proteína. En el caso de las digestiones llevadas a cabo con tripsina puede observarse que las cinéticas de degradación de las enzimas CPL1 y CPL7 que llevan a la aparición de los fragmentos F1 y F7 respectivamente, es muy diferente (figura 26). Mientras que a tiempos de digestión cortos el fragmento F1 aparece libre de productos intermedios de mayor peso molecular, la aparición del fragmento F7 es simultánea a la aparición de otros dos productos de pesos moleculares intermedios entre este fragmento y la lisozima CPL7. Dado que las proteínas F1 y F7 constituyen los dominios N-terminales de las lisozimas, la cinética de degradación debe de relacionarse con la estructura del dominio C-terminal, que es el que resulta digerido. La comparación del tamaño del fragmento F1 con el de la proteína N-CPL1 (figura 25) unido a pruebas indirectas como la valoración de los grupos SH libres (tabla 7) induce a pensar que la zona límite de proteolisis de la lisozima CPL1 por tripsina se encontraría aproximadamente situada en la mitad del primero de los seis motivos repetidos que forman la región C-terminal de la proteína (motivo P1) (figura 5). Estos resultados estarían de acuerdo con la predicción de estructura secundaria que se muestra en la figura 15, según la cual la región C-terminal sería rica en estructuras de tipo giro β y ordenación aperiódica que favorecerían teóricamente la accesibilidad de las proteasas a los enlaces susceptibles de hidrólisis, mientras que el dominio

N-terminal mostraría una estructura más compacta. Cabría resaltar que para el motivo P1 se predice un alto contenido de giros β , de los cuales se conoce su tendencia a situarse en la superficie de las proteínas, lo que sugiere que este motivo constituye una especie de *linker* entre los dominios N y C-terminales y que debe de tratarse de una zona de fácil acceso para la tripsina.

Por otro lado, la adición de colina al medio de reacción origina un retraso en la digestión de la lisozima CPL1 tanto por tripsina como por quimotripsina (figuras 26 y 29), lo que indicaría que la colina induce un cambio conformacional en el dominio C-terminal que le haría más resistente a la acción de la proteasa.

El estudio de la degradación de la lisozima CPL7 por tripsina permite obtener otra serie de conclusiones. La aparición simultánea de tres fragmentos a tiempos cortos significa la existencia de otros tantos sitios de proteólisis igualmente accesibles a la proteasa. Puesto que el dominio C-terminal de la lisozima CPL7 está formado de tres motivos exactamente iguales en secuencia (M1, M2 y M3) (figura 5) cabría esperar que la tripsina actuara con igual probabilidad sobre cada uno de ellos. Cada motivo posee cuatro aminoácidos básicos situados en las secuencias Glu-Arg-Tyr, Asn-Arg-Gly, Asp-Lys-Val y Ala-Arg-Glu. En tres de estas regiones existen aminoácidos ácidos contiguos en secuencia a los aminoácidos básicos; este hecho es conocido como un factor negativo en cuanto a la acción proteolítica de la tripsina (Mihalyi, 1972). Por tanto se puede especular con la posibilidad de que el dominio C-terminal de la lisozima CPL7 tenga una estructura trilobular a causa de la disposición de los tres motivos M1 a M3, con las secuencias Asn-Arg-Gly de cada motivo situadas en la superficie de la molécula e igualmente accesibles a la tripsina.

La curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) obtenida para la lisozima CPL1 puede descomponerse en la suma de dos transiciones (figura 31). La deconvolución de una curva de DSC en varias generalmente es indicio de la existencia de dominios en la proteína, cada uno de ellos con unas características termodinámicas diferenciadas del resto (Privalov, 1989; Mevdev y cols., 1989). La comparación de las dos transiciones mencionadas con los dominios sintetizados individualmente permite asignar la primera de las transiciones de la curva

de DSC de la lisozima CPLI al dominio C-terminal puesto que además éste está presumiblemente implicado en el reconocimiento de colina y la adición del ligando provoca los cambios más destacables en la primera transición (figura 33). De igual modo, la segunda de las transiciones correspondería al dominio N-terminal.

El perfil de absorción de calor de la lisozima CPLI sufre variaciones significativas en el rango de pH comprendido entre 6,0 y 8,0 (figura 32). La deconvolución de las curvas posibilita el seguimiento de los dos dominios. Así, mientras los parámetros del dominio C-terminal no muestran cambios importantes, el dominio N-terminal parece desestabilizarse conforme aumenta el pH (tabla 10), pues la entalpía de la transición disminuye drásticamente mientras que la T_m baja. El fragmento FI parece seguir el mismo comportamiento (figura 34), poniéndose más en evidencia a pH 8,0 la asimetría de la transición. Es interesante comprobar que mientras la T_m del fragmento FI a pH 6,0 es de 61°C, la T_m de la segunda transición de la lisozima CPLI completa a ese pH es de 50,7°C, considerablemente inferior. Este resultado indicaría que la interacción entre el dominio C-terminal y el N-terminal provoca una cierta desestabilización de éste último cuando se encuentra formando parte de la lisozima.

La adición de colina provoca una estabilización del dominio C-terminal, que se traduce en un aumento de la T_m y de la entalpía de desnaturalización (tabla 9). Este dato estaría de acuerdo con el hecho de que la presencia de colina aumenta la resistencia del dominio C-terminal a su digestión con proteasas (figuras 26 y 29). La saturación con el ligando da lugar a una curva con una sola transición (figura 33), aunque no se puede distinguir entre la posibilidad de que la proteína se esté desplegando cooperativamente o que las dos transiciones ocurran a temperaturas muy parecidas. El hecho de que a bajas concentraciones de colina se observe una disminución en la entalpía de la transición asignada al dominio N-terminal parece corroborar la primera de las hipótesis, puesto que la adición de colina al fragmento FI no induce cambios en éste. Un caso parecido a éste es el de la hexoquinasa (Takahashi y cols., 1981). Esta es una proteína con dos dominios entre los que existe una hendidura que es donde se une su sustrato, la glucosa. La unión de esta molécula provoca un acercamiento entre los dos dominios que termina por cerrar la hendidura en donde se encuentra la glucosa, de modo que la proteína funde cooperativamente con una sola transición.

4. MECANISMO DE REACCION DE LA LISOZIMA CPL I

Los experimentos llevados a cabo por Fouche y Hash en 1978 sobre la lisozima del hongo *Chalara* condujeron a la formulación de la hipótesis de que dos aminoácidos ácidos, el Asp-6 y el Glu-33 estarían implicados en el mecanismo de acción catalítica. La comparación de secuencias entre la lisozima de *Chalara* y la lisozima CPL I reveló una gran similitud en la región amino-terminal de las moléculas, destacándose la conservación en la secuencia de la lisozima CPL I de los dos aminoácidos ácidos presumiblemente implicados en la catálisis (Asp-9 y Glu-36) (figura 4) (García y cols, 1988). Es necesario recordar que el mecanismo propuesto por Blake y cols (1987) para la acción catalítica de la lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL) supone la participación de un residuo de ácido aspártico (Asp-52) y otro de glutámico (Glu-35).

La mutación de los residuos Asp-9 y Glu-36 de la lisozima CPL I conduce a una serie de resultados diversos, pero cabe destacar el hecho de que la sustitución de los aminoácidos ácidos no elimina completamente la actividad lítica de la lisozima sobre paredes de neumococo (tabla 12). La sustitución del Asp-9 por Asn origina una proteína mutante con un 2% de actividad comparado con la enzima nativa, mientras que el cambio de Glu-36 por Gln sólo provoca un 33% de pérdida de eficiencia catalítica. Si el papel de estos dos residuos fuera tan esencial como suponen Blake y cols. (1967) o Fouche y Hash (1978) dichas mutaciones tendrían que haber conducido a una proteína completamente inactiva.

Desde la formulación de la hipótesis de Blake y cols. (1967) (capítulo 3 de la Introducción) (figura 6), se han realizado muchos experimentos que estarían de acuerdo con el mecanismo propuesto, aunque otros no se ajustan al modelo. Ciertos autores (Sinnott, 1987) no creen que el oxocarboación intermedio del residuo de ácido murámico sea lo suficientemente estable como para poder esperar a la difusión del grupo saliente y la entrada de una molécula de agua, sobre todo cuando existe un aminoácido como el Asp-52, cargado y relativamente cercano. Por tanto, según este modelo, el catión reaccionaría con el Asp-52 originando un intermedio covalente. Aunque no hay datos suficientes que permitan dilucidar entre los dos mecanismos, según Sinnott el intermedio covalente es completamente necesario

para explicar el mecanismo de otras glicosidasas que, como la HEWL, actúan con retención de configuración. El papel del Asp-52 en la catálisis es también discutible teniendo en cuenta el trabajo experimental realizado por Malcolm y cols. (1989), en el cual se sustituyó dicho residuo por su amida (Asn-52) mediante mutagénesis dirigida, con lo que se obtenía una proteína mutante que todavía conservaba un 5% de actividad con respecto a la enzima nativa sobre paredes de *M. luteus*. Asimismo, el trabajo teórico de Dao-pin y cols (1989) sobre el campo electrostático calculado en la zona alrededor del sitio activo de la lisozima induce a pensar que la carga neta del Asp-52 no sería esencial para la actividad catalítica, puesto que las interacciones electrostáticas en el centro activo, consideradas como muy importantes en el mecanismo catalítico, no dependerían del estado de protonación del ácido aspártico. Por último, aunque ha sido postulado (Jollès y Jollès, 1984) que en la lisozima de clara de huevo de ganso (GEWL), los residuos Glu-73 y Asp-86 podrían corresponder al Glu-35 y Asp-52 de la HEWL, una comparación de las estructuras tridimensionales de las enzimas HEWL, GEWL y T4L (Weaver y cols., 1985) mostró que ninguno de los dos residuos Asp-86 y Asp-97 de la GEWL se encontrarían en posiciones comparables a los correspondientes Asp-52 de la HEWL o Asp-20 de la T4L, sino a distancias considerablemente grandes y, por tanto, más lejos del enlace a hidrolizar.

También existen puntos de controversia en cuanto al proceso de protonación del grupo saliente (sobre el O_4 del residuo E del sustrato, según la nomenclatura de Blake y cols., 1967), atribuido al residuo Glu-35. Por ejemplo, una parte de la secuencia de la lisozima de *B. subtilis* YT-25 es similar a la secuencia de la HEWL que contiene a los aminoácidos ácidos presentes en el centro activo (Kamei y cols., 1988). El examen de estas secuencias similares revela la existencia de un residuo de ácido aspártico de la lisozima de *B. subtilis* situado en una posición análoga a la del Asp-52 de la HEWL, pero no existe ningún aminoácido ácido que pudiera corresponder al Glu-35. Del mismo modo, no hay acuerdo sobre la función real del aminoácido Glu-11 de la lisozima del bacteriófago T4 (T4L), el cual según algunos autores correspondería al Glu-35 de la HEWL, afirmación que no resulta tan evidente para otros (Anderson y cols., 1981; Sinnott, 1987), puesto que en la T4L el Glu-11 se encuentra situado comparativamente más lejos del O_4 del residuo D, además de estar muy cerca de un residuo de arginina (Arg-145), interaccionando con él por medio de un puente salino que supondría la

desprotonación del grupo ácido. Los mismos autores han sugerido la posibilidad de que la protonación del grupo saliente puede llevarse a cabo por una molécula de agua, puesto que hay espacio para ella entre el Glu-11 y el residuo D de la cadena glicánica. Imoto y cols. (1972) resaltan el hecho de que la lisozima es capaz de catalizar la hidrólisis de la pared celular a pH 9, donde el Glu-35 se encontraría presumiblemente desprotonado, lo que sugeriría que el papel de este residuo como catalizador ácido no es esencial, mientras que su carga negativa a ese pH podría contribuir a la estabilización del ión carbonio. De todos modos, cabría la posibilidad de que el pK_a del Glu-35 pueda alcanzar valores más altos que los calculados tras la unión del sustrato. Por último, es necesario señalar el hecho de que las glicosidasas en general pueden catalizar la hidrólisis de compuestos de glicosil-piridinio en procesos en los que la protonación del grupo saliente es imposible, adquiriendo por tanto gran importancia en esta clase de enzimas otro tipo de interacciones no covalentes además de las propuestas. Todos estos datos llevan a la conclusión de que aún permanecen puntos oscuros en el mecanismo descrito por Blake y cols (1967), a pesar de constituir uno de los mas estudiados.

Al analizar las secuencias amino-terminales de las lisozimas de los fagos Cp-1, mv1 y T4, así como las lisozimas de *C. acetobutylicum*, *S. globisporus* y *Chalara* (figura 4), se observa que en todas, excepto en la T4L, se conservan los residuos Asp-9 y Glu-36 de la lisozima CPL1. Existen otros aminoácidos que también se conservan en la misma posición, como son Gly-26, Lys-33 y Tyr-40. Otras posiciones se encuentran muy conservadas. Así, el aminoácido 10 es valina o isoleucina; el residuo 14 es en casi todos los casos una glutamina, aunque en la lisozima CPL1 es una asparagina, el aminoácido 31 es isoleucina o tirosina; el 32 es isoleucina en casi todos los casos; el residuo 35 es treonina excepto en la CPL1, en donde se encuentra una serina; por último, el aminoácido 37 es mayoritariamente una glicina. Incluso puede encontrarse una cierta similitud entre una pequeña región de la T4L y el resto en la posición 36, correspondiente al glutámico presumiblemente implicado en el centro activo de la lisozima de *Chalara* y de la lisozima CPL1, si bien este aminoácido no ha sido descrito como esencial en el mecanismo catalítico de la lisozima del fago T4 (Anderson y cols., 1981).

Por otra parte, parece que los experimentos de Fouche y Hash (1978) sobre el centro activo de la lisozima de *Chalara* llevaron a los autores del trabajo a obtener una serie de

conclusiones demasiado aventuradas a partir los resultados presentados. La modificación química de los residuos ácidos de la proteína conduce a la pérdida total de actividad, mientras que la misma modificación en presencia de un inhibidor competitivo permite la recuperación de un 40% de actividad. Los análisis demuestran que los dos aminoácidos Asp-6 y Glu-33 se protegen de la modificación química en presencia del inhibidor, pero no demuestran que los dos sean esenciales en la catálisis, sino que al menos uno de ellos lo es.

En cuanto a la lisozima CPLI, los experimentos de mutagénesis dirigida parecen demostrar que el Asp-9 es un residuo muy importante en el proceso catalítico. En el mejor de los casos su sustitución se corresponde con un 2% de actividad con respecto a la proteína nativa. La inclusión de un aminoácido cargado positivamente (Lys) o apolar (Ala) provoca la inactivación total o casi total de la proteína. Sin embargo el residuo Glu-36 parece tener mucha menos importancia en la catálisis (tabla 12). El componente estérico parece tener más importancia en este caso que el componente de carga, pues el mutante E36Q es dos veces más activo que el mutante E36D. Los mutantes E36Q y E36D son capaces de actuar *in vivo* sobre la pared celular de neumococo como se desprende de los experimentos de curación fenotípica (figura 39), aunque con una eficacia de un 10% con respecto a la proteína nativa. La extraordinaria sensibilidad del método de valoración enzimática sobre paredes marcadas radiactivamente permite cuantificar muy bajas actividades catalíticas (como la del doble mutante Ala-9, Ala-36), las cuales habrían podido pasar desapercibidas si se hubieran seguido otros métodos de valoración mucho menos sensibles.

Es necesario señalar que, aparentemente, el componente peptídico del peptidoglicano de la pared celular de *S. pneumoniae* parece ser esencial en el mecanismo de reconocimiento del sustrato por parte de la lisozima CPLI (figura 40). Los diferentes tipos de lisozimas también presentan distintos requerimientos de sustrato (Schindler y cols., 1977). Así, las lisozimas de tipo c y g son capaces de hidrolizar los polímeros de NAG-NAM tanto si los residuos de ácido murámico están sustituidos con el péptido como si no lo están, si bien las lisozimas de tipo c son también capaces de hidrolizar polímeros de NAG (actividad quitinasa), al contrario que las de tipo g. Las lisozimas de plantas, sin embargo, poseen una estricta especificidad sobre oligosacáridos de quitina (poli-NAG), presentando una baja actividad sobre

las cadenas de NA 3-NAM sustituidas con péptidos o no. Por último, las lisozimas de lagos como el T4 sólo son capaces de hidrolizar la cadena glicánica allí donde los residuos de ácido murámico se encuentran sustituidos con el componente peptídico. Este hecho indicaría una adaptación de la enzima al sustrato, que en este caso es el peptidoglicano de *E. coli* donde la mayoría de los residuos de murámico están sustituidos. El requerimiento del péptido por parte de la lisozima CPL1 puede estar indicando asimismo este tipo adaptación a la pared celular de neumococo.

5. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS DOMINIOS C-TERMINALES DE LAS PEPTIDOGLICAN-HIDROLASAS DE *S. PNEUMONIAE*

La extraordinaria afinidad de los dominios C-terminales de las enzimas líticas de la pared de neumococo por DEAE-celulosa llevó a pensar en su posible aplicación biotecnológica como dominios que, una vez fusionados a una proteína de interés, permitieran la purificación de ésta. Las ventajas de la utilización de resinas del tipo de DEAE-celulosa en procesos de purificación por afinidad y de inmovilización de enzimas son evidentes: existen muchos soportes comerciales que contienen DEAE, es factible su utilización en procesos a gran escala y son fácilmente regenerables, por lo que su empleo a nivel industrial es muy adecuado.

El plásmido pCM16 (figura 41) contiene una secuencia de fusión entre el dominio C-terminal de la lisozima CPLI (C-CPLI) y la del gen *lacZ* que codifica para la β -galactosidasa de *E. coli*. La expresión del gen de fusión está controlada por los promotores de la lipoproteína y del operón de la lactosa, lo que posibilita una alta producción de proteína (figura 42) (Inouye e Inouye, 1985). La proteína de fusión fue purificada en un solo paso en una columna de DEAE-celulosa a partir de extractos de cultivos de *E. coli* TGI [pCM16] inducidos con IPTG. Además de la importancia de la purificación de la β -galactosidasa en sí misma, el valor real del experimento reside en la validez de la utilización del dominio C-CPLI para este método de purificación. La presencia de una doble banda cuando la proteína híbrida se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS podría ser debido a una degradación de la misma. Sin embargo, el hecho de que la banda inferior migrara en la misma posición que la banda correspondiente a la β -galactosidasa podría indicar la producción en cierta proporción de esta proteína no fusionada al dominio C-CPLI. Esta hipótesis parece bastante probable, puesto que, como se observa en la figura 41, en la región de fusión existe una secuencia que podría corresponder a un sitio de unión al ribosoma seguida de un codón ATG que podría actuar como iniciador de la traducción. Para comprobar esta hipótesis se intentó realizar el análisis de la secuencia N-terminal de la proteína de fusión, si bien la proteína se mostró resistente al tratamiento, debido probablemente al bloqueo del extremo amino-terminal. La proteína C-CPLI- β -galactosidasa mantenía una actividad específica comparable a la descrita para la enzima nativa (Miller, 1972). Puesto que la inmovilización de enzimas es un procedimiento muy

importante en procesos biotecnológicos (Hartmeier, 1988) parecía interesante comprobar si la proteína de fusión mantenía la actividad cuando se inmovilizaba en la resina de DEAE-celulosa. Se observó que un 63% de actividad enzimática se mantenía en estas condiciones, lo que sugiere que la alta afinidad del dominio C-CPLI por el DEAE podría emplearse con éxito para la inmovilización de otras enzimas de interés.

Aunque en la proteína de fusión producida por el plásmido pCM16 el dominio C-CPLI ocupa una posición N-terminal, éste mantiene sus propiedades funcionales intactas. Este resultado demuestra que la consecución de la estructura funcionalmente óptima del dominio C-CPLI es independiente del o de los polipéptidos a los que se encuentra unido, lo cual constituye una prueba más a favor de la calificación de este dominio como módulo (apartado anterior). No obstante, resultaba de gran interés comprobar el comportamiento del módulo C-CPLI fusionado en la posición C-terminal de la β -galactosidasa. Para ello se construyó el plásmido pCM11 (figura 43), si bien esta construcción genera una proteína inactiva (Young y Davis, 1983). La proteína de fusión se hiperprodujo y se retuvo en la resina de DEAE-celulosa incluso lavando con 1.5 M en NaCl, demostrándose así que la funcionalidad del dominio C-CPLI no se había perdido. Sin embargo, en este caso, la interacción con el DEAE debe provocar en la proteína un cambio conformacional tal que impida la accesibilidad de las moléculas de colina libre al dominio C-CPLI, no pudiéndose lograr por este motivo la elución de la proteína sino con agentes desnaturalizantes como el SDS. Este experimento, aun siendo negativo en lo que a la purificación se refiere, aporta un interesante resultado sobre el uso de los dominios C-terminales dependientes de colina para procesos de inmovilización de enzimas en columna.

Otra de las ventajas de los dominios C-terminales de las peptidoglicán-hidrolasas de neumococo en la producción de proteínas de fusión reside en su utilización como sonda de seguimiento en los pasos de purificación de dichas proteínas de fusión cuando éstas no tienen ninguna funcionalidad medible ni se poseen anticuerpos contra ellas, ya que sí se pueden utilizar anticuerpos que reaccionan con el dominio C-terminal. Este es el caso de la fusión del módulo C-terminal de la amidasa LYTA (C-LYTA) con la región de la cadena β del receptor de células T de la línea celular Jurkatt que contiene las regiones $V_{\beta}8.1$, D y J (proteína TcR $\beta 8.1$) (figura

45) (Wilson y cols., 1988). El objetivo era la purificación de esta proteína para la obtención de anticuerpos que la reconocieran. El motivo por el que la purificación no pudo llevarse a cabo por el procedimiento deseado (DEAE-celulosa) fue el hecho de que la proteína de fusión formaba cuerpos de inclusión (figura 47). Los cuerpos de inclusión son agregados insolubles que precipitan dentro de la propia bacteria y que contienen, además de la proteína producida por el plásmido en cuestión, otras proteínas como las cuatro subunidades de la RNA polimerasa, e incluso DNA y RNA (Hartley y Kane, 1988). Es muy frecuente encontrarlos cuando se desea la expresión de proteínas eucariotas en sistemas procariotas como *E. coli* (Marston, 1986) y pueden constituir una ventaja en procesos biotecnológicos puesto que la proteína de interés se encuentra en estos agregados en un alto grado de pureza, y frecuentemente puede recuperarse de éstos en forma nativa (Kane y Hartley, 1988). La formación de cuerpos de inclusión no depende necesariamente de la mayor o menor cantidad de proteína producida en la célula (Marston, 1986). Realmente intervienen muchos y muy diversos factores, cada uno con una mayor o menor incidencia dependiendo de las características de cada proteína en concreto. Entre los factores que pueden conducir a la formación de cuerpos de inclusión hay que destacar la presencia de grupos sulfidrilos libres o temperaturas de cultivo que imposibilitan que la proteína adquiera su conformación correcta desde que se biosintetiza la cadena polipeptídica. Otro motivo podría ser que la proteína se biosintetice con tanta rapidez que los sistemas de degradación de la célula se saturan y la proteína termine por acumularse. En último término, la precipitación de la proteína en forma de cuerpos de inclusión va a venir determinada por la facilidad que tenga en conseguir su conformación nativa por lo que para evitar la formación de los cuerpos es necesario actuar sobre los parámetros que determinan el plegamiento de las proteínas. Así, una menor temperatura de cultivo o una menor inducción de la expresión génica provocan una menor velocidad de biosíntesis de la proteína y por tanto ésta tiene más posibilidades de adquirir la conformación correcta. En el caso de la fusión C-LYTA-TcR β 8.1 sólo una incubación a 25°C pudo evitar la formación de agregados aunque la producción de proteína fue mínima.

Una vez obtenidos los cuerpos de inclusión, la recuperación de la proteína de fusión en forma nativa pasa por la solubilización de los agregados, la cual se realiza frecuentemente mediante agentes desnaturalizantes, procediéndose después a la renaturalización de la proteína

(Marston, 1986). Sin embargo, el empleo de compuestos como la urea, cloruro de guanidinio y diversos detergentes no permitieron la renaturalización de la proteína de fusión, por lo que se desechó la idea de purificación por DEAE-celulosa, obteniéndose la proteína en forma pura por electroelución de geles de poliacrilamida-SDS. Ya que el objetivo era la obtención de anticuerpos que reaccionaran con la proteína, no revestía mayor importancia que ésta se encontrara desnaturalizada. A pesar del contratiempo que supuso la formación de cuerpos de inclusión el dominio C-LYTA se mostró de gran utilidad puesto que permitió seguir los pasos de purificación de la proteína de fusión mediante técnicas de "Western-blot" utilizando los anticuerpos que reconocen el módulo C-terminal.

V CONCLUSIONES

Las conclusiones que se derivan de los resultados presentados en este trabajo de investigación son las siguientes:

- 1.- Existe una variedad de compuestos análogos de colina capaces de interactuar específicamente con las peptidoglicán-hidrolasas dependientes de colina de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos. La estructura química requerida es la de una amina terciaria. La hidrofobicidad de los sustituyentes del átomo de nitrógeno favorece la interacción.
- 2.- Las peptidoglicán-hidrolasas dependientes de colina de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos pueden purificarse en un solo paso mediante cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa.
- 3.- Según los datos de dicroísmo circular, la estructura secundaria de la lisozima CPLI estaría compuesta de un 19% de α -hélice, 35% de lámina β , 32% de giros β y 14% de ordenación apenódica. La probable contribución de los aminoácidos aromáticos en la región del ultravioleta lejano dificulta el análisis de los espectros en base a contribuciones de estructura secundaria.
- 4.- La unión de colina a la lisozima CPLI provoca un cambio conformacional en la proteína que afecta a la disposición espacial de los residuos de triptófano.
- 5.- La lisozima CPLI posee un único tipo de sitios para la unión de colina. La constante de disociación del ligando es de 2,4 mM.
- 6.- Las tres cisteínas de la lisozima CPLI contienen sus grupos SH libres. La cisteína 238 se encuentra inaccesible al disolvente cuando la proteína está en su conformación nativa.
- 7.- El dominio N-terminal de la lisozima CPLI mantiene su capacidad catalítica cuando se sintetiza en ausencia del dominio C-terminal, si bien pierde la especificidad por paredes que contienen colina en el ácido teicoico y su eficiencia catalítica es mucho menor.

8.- Los dominios N-terminales de las lisozimas CPL1 y CPL7 poseen una estructura más compacta que los respectivos dominios C-terminales, de modo que resultan más resistentes a la degradación por proteasas.

9.- El dominio C-terminal de la lisozima CPL1 mantiene su capacidad de unión de colina cuando se sintetiza en ausencia del dominio N-terminal.

10.- Las características termodinámicas del dominio C-terminal permanecen prácticamente inalteradas tanto en presencia como en ausencia del dominio N-terminal.

11.- La colina induce un cambio conformacional en el dominio C-terminal de modo que éste se estabiliza térmicamente y se hace más resistente al ataque por proteasas.

12.- La desnaturalización térmica del dominio C-terminal de la lisozima CPL1 es irreversible, en tanto que la correspondiente al dominio N-terminal es parcialmente reversible, dependiendo de la temperatura a la que se detenga el proceso de desnaturalización.

13.- El aminoácido Asp-9 de la lisozima CPL1 es muy importante para la actividad catalítica de la enzima, si bien su sustitución por su correspondiente amida no ocasiona la pérdida total de actividad.

14.- El aminoácido Glu-36 de la lisozima CPL1 desempeña sólo un papel de relativa importancia en la catálisis, ya que la sustitución de este residuo por glutamina tan solo origina la pérdida de un 30% de actividad.

15.- El dominio C-terminal de la lisozima CPL1 mantiene su afinidad por colina cuando se fusiona a la β -galactosidasa. La proteína de fusión se purificó en un solo paso mediante cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa.

16.- La fusión de la β -galactosidasa con el dominio C-terminal permitió la inmovilización de la proteína híbrida en columnas de DEAE-celulosa. La enzima inmovilizada posee un 63% de actividad con respecto a la proteína en disolución.

17.- Los resultados presentados en esta memoria demuestran que los dominios N- y C-terminales que forman parte de la lisozima CPLI conservan su funcionalidad por separado, lo que constituye una prueba más en favor de la teoría modular aplicada a la evolución de las peptidoglicán-hidrolasas de *S. pneumoniae* y sus bacteriófagos.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Adinolfi, M. en: *Immunological aspects of infection in the fetus and newborn*. (H.P. Lambert y C.B.S. Wood eds.) Academic Press, London 1981, pp 19-47.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1983. En *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. NY.
- Alexander, S.S. jr., Colonna, G. y Edelhoch, H. 1979 *J. Biol. Chem.* **254**: 1501-1505.
- Anderson, W.F., Grütter, M.G., Remington, S.J., Weaver, L.H. y Matthews, B.W. 1981 *J. Mol. Biol.* **147**: 523-543.
- Armstrong, J. J., Baddiley, J., Buchanan, J. G., Carss, B. y Greenberg, G. R. 1958. *J. Chem. Soc.* 4344-4354.
- Badger, E., 1944. *J. Biol. Chem.* **153**: 183-191.
- Banas, J. A., Russell, R. R. B. y Ferreti, J. J. 1990. *Infect. Immun.* **58**: 667-673.
- Barnickel, G., Nauman, D., Bradaczek, H., Labischinski, H. y Giesbrecht, P. 1983. En *The Target of Penicillin* (Hakenbeck, R., Höltje, J. V. y Labischinski, H., eds.) pp. 61-66. W. de Gruyter, Berlin.
- Barroso, L. A., Wang, S. Z., Phelps, C. J., Johnson, J. L. y Wilkins, T. D. 1990. *Nucleic Acids Res.* **18**: 4004-4005.
- Beacham, I. R. 1979. *Int. J. Biochem.* **10**: 877-883.
- Beechem, J.M. y Brand, L. 1985 *Annu. Rev. Biochem.* **54**:43-71.
- Beveridge, T. J. 1981. *Int. Rev. Citol.* **72**: 229-317.
- Biggar, W.D. y Sturgess, J.M.. *Infect. Immunol.* **16**: 974-982.
- Birnboim, H. C. y Doly, J. 1979. *Nucleic. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Blake, C. C. F. 1978. *Nature* **273**: 267.
- Blake, C.C.F., Johnson, L.N., Mair, G.A., North, A.C.T., Phillips, D.C. y Sarma, V.R. 1967 *Proc. Roy. Soc. London B*:**167**, 378-388.
- Blási, U., Nam, K., Hartz, D. Gold, L. y Young, R. 1989. *EMBO J.* **8**: 3501-3510.
- Boizet, B., Lahbib-Mansais, Y., Dupont, L. Ritzenthaler, P. y Mata, M. *Gene* **94**: 61-67.
- Bolotina, T.A., Chekhov, V.O., Lugauskas, V.Yu. y Pitsyn, O.B. 1980 *Mol. Biol. (Moscu)*. **14**: 902-908. (Traducción al inglés, pág 709 (1981)).
- Botstein, D., Chan, R. K. y Waddel, C.H. 1972. *Virology* **49**: 268-282.
- Boyer, H. W. y Roulland-Dussoix, D. 1969. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-474.
- Bradford, M. M. 1976. *Anal. Biochem.* **72**: 248-256.
- Brahms, S. y Brahms, J. 1980 *J. Mol. Biol.* **138**: 149-178.
- Brent, R. y Ptashne, M. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 4204.
- Briese, T. y Hakenbeck, R. 1985. *Eur. J. Biochem.* **146**: 417-427.
- Briles, E. B. y Tomasz, A. 1970. *J. Cell Biol.* **47**: 786-790.

- Brundish, D. E. y Baddiley, J. 1968. *Biochem. J.* 110: 573-582.
- Casadaban, M. J., Martínez-Arias, A., Shapira, S. K. y Chou, J. 1983. *Methods Enzymol.* 100: 293-308.
- Casadaban, M. J., Martínez-Arias, A., Shapira, S. K. y Chou, J. 1983. *Methods Enzymol.* 100: 293-308.
- Chang, C.T., Wu, C.-s.C. y Yang, J.T. 1978. *Anal. Biochem.* 91:13-31.
- Chou, P. y Fasman, G.D. 1978. *Annu. Rev. Biochem.* 47:251-256.
- Croux, C. y García, J.L. 1990. *Gene* (en prensa)
- Dao-pin, S., Liao, D-I. y Remington, S.J. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5361-5365
- de Graaf, F. K. y Oudega, B. 1986. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 125: 183:205.
- DeMartini, M., Halegoua, S. y Inouye, M. 1975. *J. Virol.* 16: 459-461.
- Díaz, E. 1991. Tesis doctoral. Universidad Complutense, Madrid.
- Díaz, E., García, E., Ascaso, C., Méndez, E., López, R. y García, J.L. 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 1238-1244.
- Díaz, E., López, R. y García, J.L. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8125-8129.
- Díaz, E., López, R. y García, J.L. 1991. *J. Biol. Chem.* 266: 5464-5471.
- Doolittle, R. F. 1986. *University Science Books*. Mill Valley, CA.
- Doolittle, R.F. 1985. *Trends Biochem. Sci.* 10: 233-237.
- Dove, S. Z., Price, S. B., Phelps, C. J., Lyerly, D. M., Wilkins, T. D. y Johnson, J. L. 1990. *Infect. Immun.* 58: 480-488.
- DuBose, R.F. y Hard, D.L. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9966-9970.
- Dunn, B.M. y Bruce, T.C. 1973. *Adv. Enzymol.* 37: 1-60.
- Edge, V., Allewell, N.M. y Sturtevant, J.M. 1985. *Biochemistry* 24: 5899-5906.
- Efink, M.R. y Ghiron, C.A. 1981. *Anal. Biochem.* 114: 199-227.
- Ellman, L.G. 1959 *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70-77.
- Fasman, G. 1976. en *Handbook of biochemistry and molecular biology*, 3ª edición vol. III. CRC Press, Cleveland, OH.
- Ferretti, J. J., Gilpin, M. L. y Russell, R. R. B. 1987. *J. Bacteriol.* 169: 4271-4278.
- Fischer, H. y Tomasz, A. 1985. *J. Bacteriol.* 163: 46-54.
- Fischer, W. 1988. *Adv. Microb. Physiol.* 29: 233-302.
- Formanek, H. 1983. En *The Target of Penicillin* (Hakenbeck, R., Høltje, J. V. y Labischinski, H., eds.) pp. 55-60. W. de Gruyter, Berlín.
- Fouche, P.B. y Hash, J.H. 1978. *J. Biol. Chem.* 253: 6787-6793
- Fox, E. N. y Wittner, M. K. 1965. *J. Bacteriol.* 89: 496-502.

- Freire, E. y Biltonen, R.L. 1978a. *Biopolymers* 17: 463-479.
- Freire, E. y Biltonen, R.L. 1978b. *Biopolymers* 17: 481-496.
- Freire, E. y Biltonen, R.L. 1978c. *Biopolymers* 17: 497-510.
- Freire, E., Osdol, W.W., Mayorga, O.L. y Sánchez-Ruiz, J.M. 1990. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19: 159-188.
- Fukada, H., Sturtevant, J.M. y Quijcho, F.A. 1983. *J. Biol. Chem.* 258: 13193-13198.
- García, E., Rojo, J. M., García, P., Ronda, C., López, R. y Tomasz, A. 1982. *FEMS Microbiol. Lett.* 14: 133-136.
- García, P., García, E., Ronda, C., López, R. y Tomasz, A. 1983a. *J. Gen. Microbiol.* 129: 489-497.
- García, P., García, E., Ronda, C., Tomasz, A. y López, R. 1983b. *Curr. Microbiol.* 8: 137-140.
- García, P., López, R., Ronda, C., García, E. y Tomasz, A. 1983c. *J. Gen. Microbiol.* 129: 479-487.
- García, P., Méndez, E., García, E., Ronda, C. y López, R. 1984. *J. Bacteriol.* 159: 793-796.
- García, E., García, J. L., Ronda, C., García, P. y López, R. 1985. *Mol. Gen. Genet.* 201: 225-230.
- García, J. L., García, E., Arrarás, A., García, P., Ronda, C. y López, R. 1987. *J. Virol.* 61: 2573-2580.
- García, E., García, J. L., García, P., Arrarás, A., Sánchez-Puelles, J. M. y López, R. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 914-918.
- García, P., García, J. L., García, E. y López, R. 1989. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158: 251-256.
- García, P., García, J. L., García, E. y López, R. 1990. *Gene* 86: 81-88.
- García-Bustos, J. F. y Tomasz, A. 1987. *J. Bacteriol.* 169: 447-453.
- García-Bustos, J. F., Chait, B. T. y Tomasz, A. 1987. *J. Biol. Chem.* 262: 15400-15405.
- García-Bustos, J. F. y Tomasz, A. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5415-5419.
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J. y Robson, B. 1978. *J. Mol. Biol.* 120:97-120.
- Garret, J., Bruno, C. y Young, R. 1990. *J. Bacteriol.* 172: 7275-7277.
- Garvey, K. J., Saeedi, M. S. e Ito, J. 1986. *Nucleic Acids Res.* 14: 10001-10008.
- Gavilanes, J. G., Menéndez-Arias, L. y Rodríguez, R. 1984. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B: 83-88.
- Ghuysen, J. M. 1977. En *The Synthesis, Assembly and Turnover of Cell Surface Components* (Poste, G. y Nicolson, G. L., eds.) pp. 463-595. Elsevier/ North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Ghuysen, J. M., 1968. *Bacteriol. Rev.* 32: 425-464.
- Gibson, T. J. 1984. *Tesis Doctoral*. Universidad de Cambridge, Inglaterra.
- Gilbert, W. 1978. *Nature* 271: 501.
- Gilmore, K. S., Russell, R. R. B. y Ferreti, J. J. 1990. *Infect. Immun.* 58: 2452-2458.

- Giudicelli, S. y Tomasz, A. 1984a. *J. Bacteriol.* 158: 1188-1190.
- Giudicelli, S. y Tomasz, A. 1984b. En *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis* (Nombela, C., ed.) pp. 207-212. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Glauner, B. y Schwarz, U. 1983. En *The Target of Penicillin* (Hakenbeck, R., Höltje, J. V. y Labischinski, H., eds.) pp. 29-34. W. de Gruyter, Berlin.
- Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolívar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. y Riggs, A.D. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:106-110.
- Goodell, E. W. y Schwarz, U. 1985. *J. Bacteriol.* 162: 391-397.
- Gorbunoff, M.J. y Timasheff, S.N. 1972. *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 413-422.
- Hall, J., Hazlewood, G. P., Barker, P. J. y Gilbert, H. J. 1988. *Gene* 69: 29-38.
- Hartley, D.L. y Kane, J.F. 1988. *Biochem. Soc. Trans.* 16: 101-102.
- Hartmeier, W. 1988. *Immobilized Biocatalysts*. Springer Verlag, Berlin.
- Hill, J., y Wannamaker, L. 1981. *J. Bacteriol.* 145: 696-703.
- Holland, I. B., Mackman, N. y Nicaud, J.-M. 1986. *Bio/Technology* 4: 427-431.
- Höltje, J. V. y Tomasz, A. 1975a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1690-1694.
- Höltje, J. V. y Tomasz, A. 1975b. *J. Biol. Chem.* 250: 6072-6076.
- Höltje, J. V. y Tomasz, A. 1976. *J. Biol. Chem.* 251: 4199-4207.
- Horne, D. y Tomasz, A. 1985. *J. Bacteriol.* 161: 18-24.
- Howard, L. V. y Gooder, H. 1974. *J. Bacteriol.* 117: 796-804.
- Hunt, A.H. y Jingersons, B. 1973 *Biochemistry* 12: 4435-4441.
- Imoto, T., Johnson, L.M., North, A.C.T., Phillips, D.C. y Rupley, J.A. en *The Enzymes* (P.D. Boyer ed) vol 7, pp 665-868. Academic Press, New York 1972.
- Inouye, M., Arnheim, N. y Sternglanz, R. 1973. *J. Biol. Chem.* 248: 7247-7252.
- Inouye, M., y Tsugita, A. 1968. *J. Mol. Biol.* 37: 213-219.
- Inouye, S. y Inouye, M. 1985. *Nucleic. Acids Res.* 13: 3101-3110.
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H.L., Bolívar, F. y Boyer, H.W. 1977. *Science* 198:1056-1063.
- Jauris, S., Rücknagel, K. P., Schwarz, W. H., Kratzsch, P., Bronnenmeier, K. y Staudenbauer, W. L. 1990. *Mol. Gen. Genet.* 223: 258-267.
- Jennings, H. J., Lugowski, C. y Young, N. M. 1980. *Biochemistry* 19: 4712-4719.
- Johnson, L.N., Cheetham, J., McLaughling, P.J., Acharya, K.R., Barford, D. y Phillips, D.C. 1988 *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 139: 81-134.
- Jollès, P. y Jollès, J. 1984. *Mol. Cell. Biochem.* 63: 165-189.
- Jürgens, V. J. y Wecknesser, J. 1985. *Ann. Inst. Pasteur* 136: 41-44.

- Kamei, K., Hara, S., Ikenaka, T. y Murao, S. 1988. *J. Biochem.* **104**: 832-836.
- Kane, J.F. y Hartley, D.L. 1988. *Trends Biotech.* **6**: 95-101.
- Khan, M.Y., Jaikaria, N.S., Frenz, D.A., Villanueva, G. y Newman, S.A. 1988. *J. Biol. Chem.* **263**: 11314-11318.
- Kieny, M. P., Lache, R. y Lecocq, J. P. 1983. *Gene* **26**: 91-99.
- Klug, A. y Rhodes, D. 1987. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 464-469.
- Kojima, N., Araki, Y. e Ito, E. 1985. *J. Bacteriol.* **161**: 299-306.
- Koshland, D. y Botstein, D. 1980. *Cell* **20**: 749-760.
- Kushner, S. R. 1978. En *Genetic engineering* (Boyer, H. B. y Nicosia, S., eds.) pp 17. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Labischinski, H., Barnikel, G., Nauman, D. y Keller, P. 1985. *Ann. Inst. Pasteur* **136**: 45-50.
- Laemmli, U. K. 1979. *Nature* **227**: 680-685.
- Lehrer, S.S. 1971. *Biochemistry* **10**: 3254-3263.
- Lichenstein, H.S., Hastings, A.E., Langley, K., Mendiaz, E.A., Rohde, M.F., Elmore, R. y Zukowski, M.M. *Gene* **88**: 81-86.
- Lim, V.I. 1974. *J. Mol. Biol.* **88**:873-894.
- López, C., Grubb, A. y Méndez, E. 1982. *FEBS Lett.* **144**: 349-353.
- López-Mayorga, O. y Freire, E. 1987. *Biophys. Chem.* **87**: 87.
- Low, B. 1968. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**: 160.
- Malcolm, B.A., Rosenberg, S., Corey, M.J., Allen, J.S., De Baetselier, A. y Kirsch, J.F. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 133-137.
- Manly, .P., Matthews, K.S. y Sturtevant, J.M. 1985. *Biochemistry* **24**: 3842-3846.
- Markiewicz, Z. y Tomasz, A. 1990. *J. Bacteriol.* **172**: 2241-2244.
- Marston, F.A.O. 1986. *Biochem. J.* **240**: 1-12.
- McDonnell, M., Ronda, C. y Tomasz, A. 1975. *Virology* **63**: 577-582.
- Menéndez Arias, L., Gómez Gutiérrez, J., García Fernández, M., García Tejedor, A. y Morán, F. 1988. *CABIOS* **4**:479-482.
- Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S.A. y Ebert, M.H. 1981. *Science* **211**: 1437-1438.
- Messing, J. 1983. *Methods Enzymol.* **101**: 20-78.
- Mevdev, L.V., Busby, T.F.. e Ingham, K.C. 1989. *Biochemistry* **28**: 5408-5414.
- Mihalyi, E. 1972. *Application of proteolytic enzymes to protein structure studies*. CRC Press, Cleveland (OH).
- Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mosser, J. L. y Tomasz, A. 1970. *J. Biol. Chem.* **245**: 287-298.

- Nauman, D., Barnickel, G., Bradaczek, H., Labischinski, H. y Giesbrecht, P. 1982. *Eur. J. Biochem.* **125**: 505-515.
- Nikaido, H. y Vaara, H. 1985. *Microbiol. Rev.* **49**: 1-32.
- Nishikawa, K. y Ooi, T. 1986 *Biochim. Biophys. Acta* **871**, 45-54.
- Nossal, N. E. y Heppel, L. A. 1966. *J. Biol. Chem.* **241**: 3055-3062.
- Pakula, T. M., Savilahti, H. y Bamford, D. H. 1989. *Eur. J. Biochem.* **180**: 149-152.
- Parsons, S.M. y Raftery, M.A. 1972. *Biochemistry* **11**: 1623-1629
- Privalov, P.L. 1989. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**: 47-69.
- Pugsley, A. P. y Schwartz, M. 1985. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 3-38.
- Romero, A., López, R. y García, P. 1990a. *J. Virol.* **64**: 137-142.
- Romero, A., López, R. y García, P. 1990b. *J. Bacteriol.* **172**: 5064-5070.
- Ronda, C., García, J. L., García, E., Sánchez-Puelles, J. M. y López, R. 1987. *Eur. J. Biochem.* **164**: 621-624.
- Rupley, J.A., Butler, L., Gerring, M., Hartdegen, F.J. y Pacoraro, R. 1967. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**: 1088-1095.
- Saedi, M., Garvey, K.J. y Ito, J. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 955-958.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (2ª edición). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez-Puelles, J. M., Ronda, C., García, J. L., García, P., López, R. y García, E. 1986a. *Eur. J. Biochem.* **158**: 289-293.
- Sánchez-Puelles, J. M., Ronda, C., García, E., Méndez, E., García, J. L. y López, R. 1986b. *FEMS Microbiol. Lett.* **35**: 163-166.
- Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L. y García, E. 1990. *Gene* **89**: 69-75.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sayers, J. R., Schmidt, W. y Eckstein, F. 1988. *Nucleic Acids Res.* **16**, 791-802.
- Schindler, M., Mirelman, D. y Sharon, N. 1977. *Biochim. Biophys. Acta* **482**: 386-392.
- Schleiffer, K. H. y Kandler, O. 1972. *Bacteriol. Rev.* **36**: 407-477.
- Schoner, B.E., Belagaje, R.M. y Schoner, R.G. 1987 *Methods Enzymol.* **153**:401-416
- Shiroza, T., Ueda, S. y Kuramitsu, H. K. 1987. *J. Bacteriol.* **169**: 4263-4270.
- Shockman, G. D. y Barret, J. F. 1983. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 501-527.
- Sinnott, M.L. en *Enzyme Mechanisms* (M.I. Page y A. Williams eds.) pp 259-297. Royal Society of Chemistry, London 1987.
- Swank, R. T. y Munkres, K. D. 1971. *Anal. Biochem.* **39**: 462-477.
- Szewczyk, B., Bienkowska-Szewczyk, K. y Kozloff, L.M. 1986. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 363-367.

- Takahashi, K., Casey, J.L. y Sturtevant, J.M. 1981. *Biochemistry* 20: 4693-4697.
- Timasheff, S.N. y Bernardi, G. 1970. *Arch. Biochem. Biophys.* 141: 53-58.
- Tipper, D. J. y Strominger, J. L. 1965. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54: 1133-1141.
- Tipper, D. J., 1969. *Biochemistry* 8: 2192-2212.
- Tomasz, A. 1964. *Bacteriol. Proc.* 29.
- Tomasz, A. 1967. *Science* 157: 694-697.
- Tomasz, A. 1968. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59: 86-93.
- Tomasz, A. 1981. *Rev. Infect. Dis.* 3: 190-211.
- Tomasz, A. y Hochtkiss, R. D. 1964. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51: 480-487.
- Tomasz, A. y Waks, S. 1975. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 1311-1319.
- Tomasz, A. y Westphal, M. 1971. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2627-2630.
- Trautwetter, A., Ritzenthaler, P., Alatossava, T. y Mata-Gilsinger, M. 1986. *J. Virol.* 59: 551-555.
- Ueda, S., Shiroza, T. y Kuramitsu, H. K. 1987. *Gene* 69: 101-109.
- Verma, M., 1986. *Curr. Microbiol.* 13: 299-301.
- Vieira, J. y Messing, J. 1982. *Gene* 19: 259.
- Wadso, J. 1968. *Acta Chem. Scand.* 22: 927.
- Weaver, L.H., Grütter, M.G., Remington, S.J., Gray, T.M., Isaacs, N.W. y Matthews, B.W. 1985. *J. Mol. Evol.* 21, 97-111.
- Weidel, W. y Pelzer, H. 1964. *Adv. Enzymol.* 26: 193-232.
- Wheeler, J., Holland, J., Terry, J. y Blainey, J. 1980. *J. Gen. Microbiol.* 120: 27-33.
- Wilson, R.K., Lai, E., Concannon, P., Barth, R.K. y Hood, L.E. 1988. *Immunol. Rev.* 101:149-172.
- Witte, A., y Lubitz, W. 1989. *Eur. J. Biochem.* 180: 393-398.
- Young, R.A. y Davis, R.W. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1194-1198.